

**HUBUNGAN POLIMORFISME INTERLEUKIN 17F rs 763780
DENGAN KERENTANAN TERHADAP TUBERKULOSIS
PARU DAN TUBERKULOSIS PARU RESISTEN OBAT DI
MALANG INDONESIA**

TUGAS AKHIR



Oleh

dr. Wayan Wahyu Semara Putra

Pembimbing

dr. Yani Jane Sugiri, Sp.P(K)

dr. Teguh Rahayu Sartono, Sp.P(K)

dr. Nanik Setijowati, M.Kes

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
PULMONOLOGI DAN KEDOKTERAN RESPIRASI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RSU Dr. SAIFUL ANWAR MALANG
2018**

DAFTAR ISI

	Halaman
Abstrak	i
<i>Abstract</i>	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Tabel	iv
Daftar Gambar	v
Daftar Singkatan	vii
Daftar Lampiran	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Imunopatogenesis Tuberkulosis	6
2.1.1 Konsep Patogenesis Tuberkulosis	6
2.1.2 Patogenesis Tuberkulosis Post Primer	8
2.1.3 Sistem Imun Bawaan pada Tuberkulosis	9
2.1.4 Sistem Imun Adaptif pada Tuberkulosis	12
2.1.5 Pembentukan Granuloma	14
2.1.6 Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa	15
2.2 Tuberkulosis Resisten Obat	20
2.2.1 Definisi	20
2.2.2 Resistensi Mycobacterium Tuberkulosis	20
2.2.3 Faktor Resiko Tuberkulosis Resisten Obat	23
2.2.3.1 Genetik	23
2.2.3.2 Penurunan Kekebalan Tubuh	24
2.2.3.3 Pengobatan Tidak Adekuat	25
2.3 Interleukin 17	26
2.3.1 Struktur Interleukin 17	27
2.3.2 Biologi Interleukin 17	28
2.3.3 Interleukin 17 pada Tuberkulosis	30
2.4 Polimorfisme	33
2.4.1 <i>Deletion/Insertion Polymorphism</i>	35
2.4.2 <i>Microsatellite Polymorphism</i>	36
2.4.3 <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	36
2.4.4 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme	37
2.4.4.1 Sekuensing DNA	37
2.4.4.2 <i>Elektroforesis Multiplex</i>	38
2.4.4.3 <i>PNA Directed PCR Clamping</i>	38
2.4.4.4 <i>Microarrays (DNA chips)</i>	38
2.4.4.5 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	39
2.4.4.6 <i>Flow Cytometry Based Genotyping</i>	40

2.4.5 Polimorfisme Gen pada Tuberkulosis	40
2.4.6 Polimorfisme Interleukin 17 pada Tuberkulosis	41
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Teori Penelitian	44
3.2 Kerangka Konsep Penelitian	47
3.3 Hipotesis Penelitian	48
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Desain Penelitian	49
4.2 Subyek Penelitian dan Besar Sampel	49
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	50
4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	51
4.5 Variabel Penelitian	51
4.6 Definisi Operasional	52
4.7 Instrumen Pengumpulan Data	54
4.8 Prosedur Pemeriksaan	55
4.8.1 Prosedur Pengambilan Darah Vena	55
4.8.2 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme IL-17 F rs 763780	56
4.8.3 Prosedur Kerja Isolasi DNA Metode <i>Salting Out</i>	56
4.8.4 Prosedur PCR (Polymerase Chain Reaction)	57
4.8.5 Prosedur Kerja Pemeriksaan RFLP	58
4.9 Teknik Pengumpulan Data	58
4.10 Alur Penelitian	59
4.11 Teknik Pengolahan dan Analisa Data	60
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN	
5.1 Karakteristik Subyek Penelitian	61
5.1.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian	61
5.1.2 Karakteristik Klinis Subyek Penelitian	63
5.2 Hasil Pemeriksaan Polimorfisme IL-17F rs 763780	66
5.2.1 Frekuensi Alel dan Genotip IL-17F rs 763780	67
5.2.2 Uji Statistik Polimorfisme IL-17F rs 763780	67
BAB 6 DISKUSI	
6.1 Karakteristik Subyek Penelitian	71
6.1.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian	71
6.1.2 Karakteristik Klinis Subyek Penelitian	73
6.2 Hasil Pemeriksaan Polimorfisme IL-17F rs 763780	75
6.2.1 Frekuensi Alel dan Genotip IL-17F rs 763780	75
6.2.2 Hubungan Polimorfisme dengan Kerentanan Tuberkulosis Paru	77
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	81
7.2 Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	91

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1	Karakteristik Interleukin 17	28
Tabel 2.2	Polimorfisme Gen pada Tuberkulosis	41
Tabel 5.1	Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian.....	61
Tabel 5.2	Keluhan Utama Subyek Penelitian Setiap Kelompok Kasus.....	63
Tabel 5.3	Gambaran Rontgen Dada Pada Setiap Kelompok Kasus.....	64
Tabel 5.4	Pemeriksaan TCM Subyek Penelitian.....	65
Tabel 5.5	Frekuensi Alel dan Genotip IL-17F rs 763780.....	67
Tabel 5.6	Hubungan Polimorfisme Kelompok TB dengan Kontrol.....	67
Tabel 5.7	Hubungan Polimorfisme Kelompok TB SO dengan Kontrol.....	68
Tabel 5.8	Hubungan Polimorfisme Kelompok TB RO dengan Kontrol.....	68
Tabel 5.9	Hubungan Polimorfisme Kelompok TB SO dengan TBRO.....	69
Tabel 5.10	Hubungan Polimorfisme Kelompok TB dengan TCM Sputum.....	70

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1	Perjalanan Infeksi Mikobakterium Tuberkulosis.....	6
Gambar 2.2	Ilustrasi Patogenesis Tuberkulosis.....	8
Gambar 2.3	Patogenesis Tuberkulosis Post Primer.....	9
Gambar 2.4	Reseptor Permukaan Makrofag	11
Gambar 2.5	Proses Pematangan Fagosit	12
Gambar 2.6	Imunitas Adaptif Tuberkulosis	13
Gambar 2.7	Ilustrasi Granuloma Tuberkulosis.....	15
Gambar 2.8	Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa	16
Gambar 2.9	Skema Terjadinya Resistensi Tuberkulosis	23
Gambar 2.10	Interleukin 17 dan Reseptornya	27
Gambar 2.11	Aksis IL-17/IL-17R	29
Gambar 2.12	Peranan IL-17 pada Tuberkulosis	31
Gambar 2.13	IL-17 Menginduksi Granuloma	32
Gambar 2.14	Spektrum Klinis Polimorfisme dan Mutasi Genetik	35
Gambar 2.15	<i>Deletion/Insertion Polymorphism</i> (DIP)	36
Gambar 2.16	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP)	37
Gambar 2.17	Pemeriksaan Polimorfisme Metode <i>Microarray</i>	38
Gambar 2.18	Ilustrasi pemeriksaan RFLP	40
Gambar 2.19	Meta Analisa Polimorfisme IL-17.....	42
Gambar 3.1	Kerangka Teori Penelitian	44
Gambar 3.2	Kerangka Konsep Penelitian.....	47
Gambar 4.1	Alur Penelitian.....	59

Gambar 5.1	Keluhan Utama Subyek Penelitian.....	63
Gambar 5.2	Gambaran Rontgen Dada Subyek Penelitian.....	64
Gambar 5.3	Distribusi Tipe Pasien TB Resisten Obat.....	65
Gambar 5.4	Hasil Polimorfisme Metode RFLP.....	66



DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BAL	: <i>Broncho Alveolar Lavage</i>
BCG	: <i>Bacille Calmette Guerin</i>
CTL	: <i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated</i>
DIP	: <i>Deletion/Insertion Polymorphism</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MDR	: <i>Multi Drug Resistant</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Mtb	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NFkB	: <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells</i>
NRAMP1	: <i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1</i>
OAT	: <i>Obat Anti Tuberkulosis</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rs	: <i>Reference SNP Cluster Id</i>

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SLC11A1 : *Solute Carrier 11a1*

TB RO : *Tuberkulosis Resisten Obat*

TB SO : *Tuberkulosis Sensitif Obat*

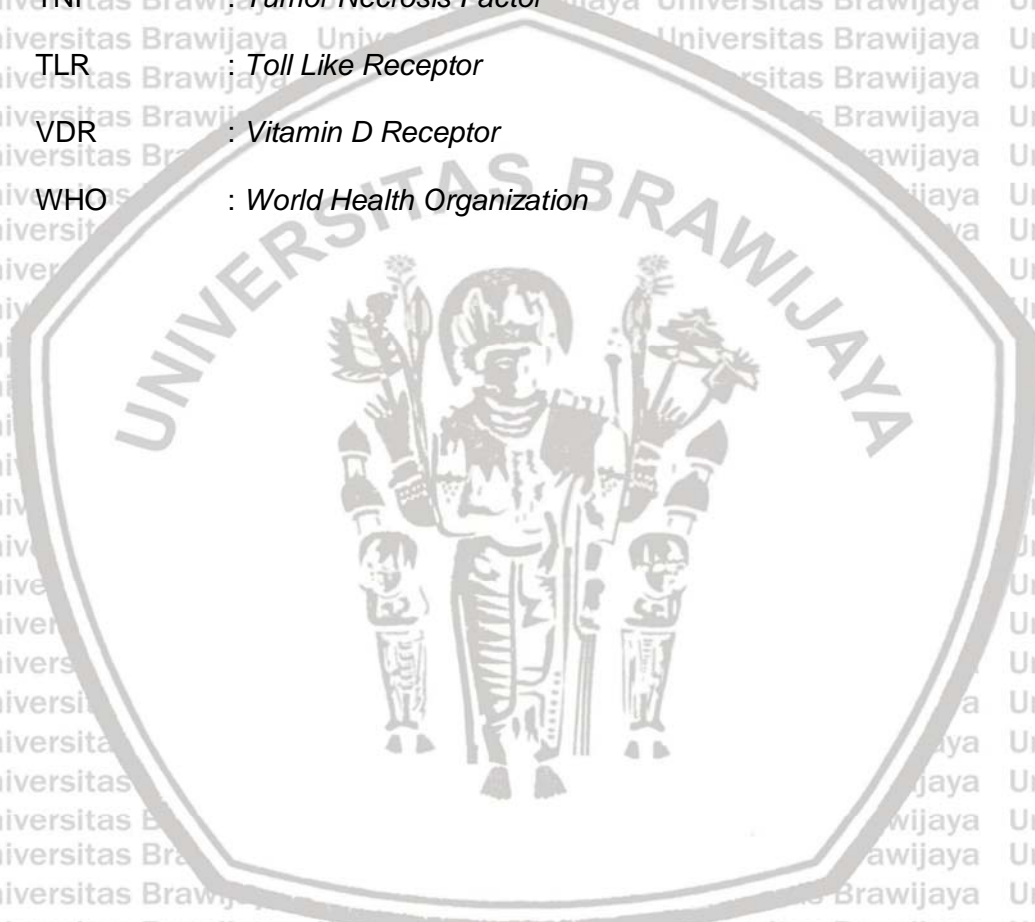
TGF : *Transforming Growth Factor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TLR : *Toll Like Receptor*

VDR : *Vitamin D Receptor*

WHO : *World Health Organization*



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Formulir Data Dasar	91
Lampiran 2 Penjelasan Untuk Mengikuti Penelitian	92
Lampiran 3 Pernyataan Persetujuan Berpartisipasi Dalam Penelitian	93
Lampiran 4 Formulir "Informed Consent"	94
Lampiran 5 Analisa Statistik	97
Lampiran 6 Kelayakan Etik Penelitian	113
Lampiran 7 Dokumentasi Proses Penelitian	114
Lampiran 8 Pernyataan Keaslian Tulisan	115
Lampiran 9 Data Subyek Penelitian	116

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Masalah**

Tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan utama di dunia. Hal ini menyebabkan gangguan kesehatan jutaan orang setiap tahun. Pada tahun 2014, diperkirakan ada 9,6 juta kasus TB baru. Angka kematian akibat TB di seluruh dunia disebutkan sebesar 1,5 juta orang yang terdiri dari 1,1 juta orang dengan HIV negatif dan 0.4 juta orang HIV positif. Indonesia termasuk kedalam tiga negara dengan jumlah penderita TB terbesar selain India dan China dengan jumlah kasus sebesar 10% dari total kasus TB diseluruh dunia (WHO, 2015). Prevalensi TB di Indonesia sebesar 0.4% dari jumlah penduduk, dengan kelompok umur terbanyak 25-34 tahun sebesar 20.76% dan jumlah kasus pada laki-laki lebih besar 1.5 kali lipat daripada perempuan (Permenkes RI, 2016).

Tuberkulosis Resisten Obat (TB RO) merupakan tantangan di dunia kesehatan dimana mempersulit pengobatan dan dibutuhkan waktu lebih lama serta biaya yang lebih besar untuk pengobatan. Kasus TB MDR (Multidrug Resistant) mendominasi jenis kasus TB RO. Di seluruh dunia, sekitar 5% kasus tuberkulosis diperkirakan merupakan TB MDR dengan proporsi terbesar pada negara negara Asia dan Eropa Timur sebesar 35% dari jumlah semua kasus. Indonesia menempati urutan ke-9 di antara 27 negara yang mempunyai beban tinggi untuk TB MDR. Hasil Survei terbaru yang dilakukan di Provinsi Jawa Timur

pada tahun 2010 menunjukkan angka 2% untuk kasus baru dan 9,7% untuk kasus pengobatan ulang. Secara global, WHO pada tahun 2011 menggunakan angka 2% untuk kasus baru dan 12% untuk kasus pengobatan ulang untuk memperkirakan jumlah kasus TB MDR di Indonesia (Kemenkes RI, 2014).

Terjadinya resistensi pada *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya faktor genetik yang menyebabkan kerentanan seseorang terhadap infeksi, terjadinya mutasi spontan pada Mtb, kepatuhan pasien terhadap pengobatan, pengobatan tuberkulosis yang tidak adekuat, dan jumlah populasi bakteri pada awal infeksi (McGrath *et al.*, 2014). Mutasi spontan Mtb erat kaitannya dengan jumlah populasi bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Colijn menyebutkan mutasi spontan pada Mtb terjadi pada setiap 10^6 - 10^9 pembelahan sel sehingga jumlah populasi Mtb yang besar berbanding lurus dengan kejadian dan meningkatkan resiko terjadinya TB RO (Zhang, 2009; Colijn *et al.*, 2011).

Sampai saat ini, masih belum jelas penyebab mengapa seseorang yang terinfeksi TB bisa menjadi sakit TB sementara yang lainnya mendemonstrasikan sistem imunitas efektif yang membatasi penyebaran Mtb sehingga bisa bertahan dari infeksi tersebut. Dari semua orang yang terinfeksi Mtb namun hanya 5 - 10% menjadi tuberkulosis aktif (Butov *et al.*, 2016). Penelitian pada orang kembar monozigot dan dizigot mengindikasikan faktor genetik seseorang berpengaruh terhadap kerentanan terhadap infeksi (Hill, 2001). Respon imunitas tubuh pada awal terjadinya infeksi Mtb diperkirakan akan menentukan perjalanan penyakit selanjutnya. Pada orang yang rentan, kegagalan imunitas tubuh mengeliminasi Mtb menyebabkan populasi Mtb meningkat dan beresiko terjadinya mutasi sehingga terjadi TB RO (Cadena *et al.*, 2016).

Kerentanan seseorang menderita TB ditentukan oleh kode genetik yang tersandi didalam gen pada untai molekul DNA. Distribusi genotip ini sangat unik untuk setiap populasi dan ras. Polimorfisme suatu gen mungkin akan mengubah struktur protein yang dihasilkan sehingga akan berpengaruh pada fenotip individu tersebut termasuk kerentanan terhadap penyakit. Beberapa penelitian tentang polimorfisme pada TB MDR diantaranya gen HLA-DRB1, NRAMP1 dan VDR di India, siltokin IL-2, IL-4 dan IL-10 di Ukraina, SLC11A1 di Jepang (Sharma *et al.*, 2003; Vasantha *et al.*, 2015; Butov *et al.*, 2016). Di Indonesia, penelitian polimorfisme pada TB MDR diantaranya gen HLA-G, IL-10 dan IFN γ (Marwoto *et al.*, 2015; Sudarmo *et al.*, 2017).

Sel limfosit T helper 17 (Sel Th 17) merupakan subset sel limfosit T yang baru. Sel ini bertindak sebagai sel utama yang menghasilkan Interleukin 17 (IL-17). Pada infeksi tuberkulosis, interleukin 17 berperan sebagai mediator awal inflamasi, pembentukan granuloma mononuclear dan rekrutmen neutrofil. Pada tikus yang defisiensi sel Th 17 dan IL-17 terjadi pembentukan granuloma yang kurang optimal sehingga jumlah populasi Mtb meningkat pesat dan beresiko terjadi diseminasi. Respon kinetik sel inflamasi menuju tempat infeksi lebih cepat sehingga sel Th 17 juga berperan sebagai respon memori pada infeksi Mtb. Interleukin 17 juga mendukung fungsi sel Th1 agar lebih optimal mengontrol infeksi tuberkulosis (Torrado *and* Cooper, 2010).

Penelitian tentang polimorfisme interleukin 17 dan kerentanan terhadap TB cukup banyak dilakukan di dunia namun hasilnya masih tidak konsisten. Penelitian di China menyebutkan polimorfisme IL-17F rs 763780 berhubungan dengan kerentanan terhadap TB (Shi *and* Zhang, 2015). Namun, penelitian di Kroasia menyatakan polimorfisme IL-17A dan IL-17F tidak berhubungan dengan

kerentanan terhadap TB (Kardum *et al.*, 2015). Hal yang cukup menarik ditemukan pada penelitian di Brazil yang menyatakan bahwa polimorfisme IL-17A justru berhubungan dengan penurunan resiko terhadap tuberkulosis (Milano *et al.*, 2016). Penelitian meta analisa menyimpulkan bahwa polimorfisme IL-17F rs 763780 berhubungan dengan kerentanan terhadap tuberkulosis namun penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu jumlah sampel yang sedikit. Dari semua penelitian tersebut, belum ada yang meneliti polimorfisme IL-17 pada kasus TB termasuk TB RO di Indonesia.

Diperlukan pemeriksaan adanya polimorfisme IL-17F untuk mengetahui adanya pengaruh genetik pada tingginya beban TB RO di Indonesia. Kemajuan biologi molekuler dan teknik sekuensing DNA telah membuka harapan adanya terapi personal pada tuberkulosis. Penelitian di Jepang tentang terapi TB laten berdasarkan polimorfisme genotip NAT2 adalah salah satu contoh penerapan terapi berdasarkan genetika. Di masa depan terapi genetik mungkin dapat dilakukan pada kelompok pasien yang sakit tuberkulosis dan memiliki polimorfisme ini untuk membantu penyembuhan penyakit tuberkulosis (Matsumoto *et al.*, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah polimorfisme gen IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru dan tuberkulosis paru resisten obat (TB RO)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui prevalensi polimorfisme gen IL-17F rs 763780 pada pasien tuberkulosis paru dan tuberkulosis resisten obat.

2. Mengetahui apakah polimorfisme gen IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru.
3. Mengetahui apakah polimorfisme gen IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru resisten obat.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Memberikan pengetahuan tentang hubungan polimorfisme genetik di Malang Indonesia terhadap kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru dan tuberkulosis paru resisten obat.

1.4.2 Manfaat Praktis

Diharapkan dengan pemahaman ini, di masa mendatang akan dikembangkan terapi genetik pada penderita dengan polimorfisme ini untuk memperbaiki daya tahan tubuh terhadap penyakit tuberkulosis paru.

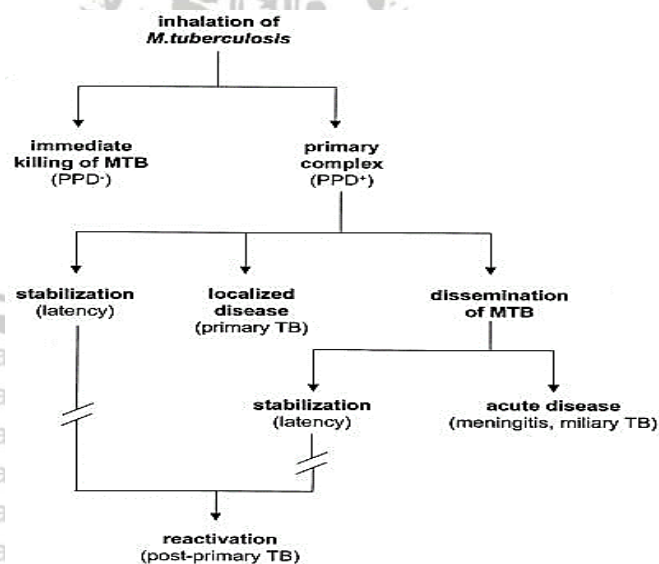
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Imunopatogenesis Tuberkulosis

2.1.1 Konsep Patogenesis Tuberkulosis

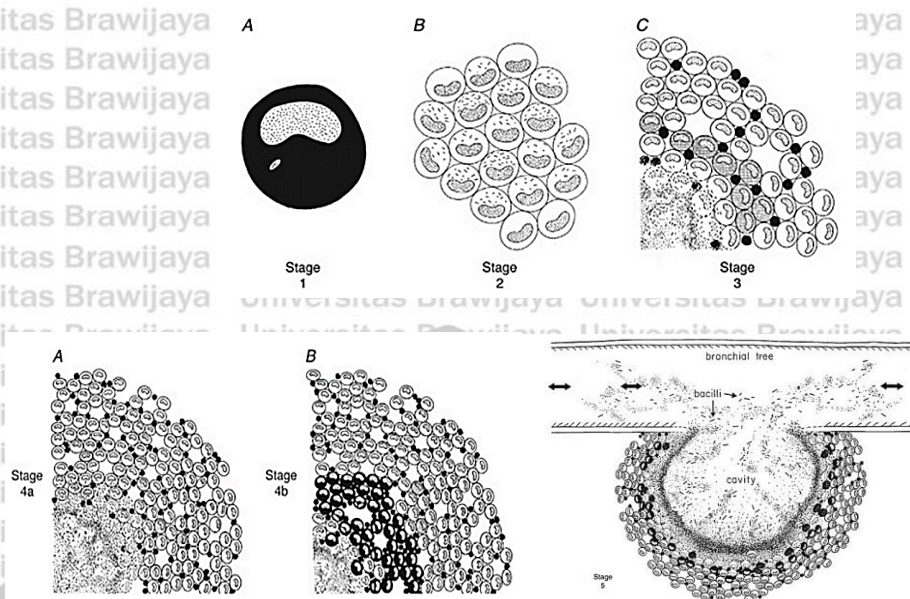
Mycobacterium tuberculosis (Mtb) harus melewati beberapa pertahanan tubuh sebelum menimbulkan infeksi dalam tubuh. Refleks batuk, mukosa dan sel epitel bersilia saluran nafas atas akan berusaha mengeluarkan Mtb yang terinhalasi melalui pergerakan *retrograde* (North and Jung., 2004). Beberapa skenario mungkin terjadi (Gambar 2.1), jika droplet yang mengandung Mtb berhasil mencapai alveoli sehingga memicu interaksi dengan sistem imunitas bawaan dan adaptif tubuh (Reinout *et al.*, 2002).



Gambar 2.1 Perjalanan Infeksi *Mycobacterium Tuberculosis*.

(Reinout *et al.*, 2002)

Melalui model infeksi Mtb pada kelinci, pathogenesis infeksi Mtb terjadi melalui 5 tahap (Gambar 2.2) (Schlossberg D, 2011). Tahap pertama (fase inisiasi) adalah ketika makrofag alveolar menghancurkan Mtb. Hanya makrofag alveolar yang aktif berhasil menghancurkan Mtb, sementara beberapa Mtb berhasil bertahan didalam makrofag alveolar yang belum aktif. Tahap kedua (fase simbiosis) dimulai ketika Mtb yang berhasil bertahan didalam makrofag mulai pertumbuhan secara logaritma didalam makrofag. Beberapa Mtb berhasil keluar dari makrofag namun segera dihancurkan oleh makrofag lainnya. Tahap ketiga (fase nekrosis kaseosa) terjadi ketika sel neutrophil dan limfosit T spesifik mulai melakukan infiltrasi. Sel T akan mengaktifkan makrofag dan menghancurkan Mtb sehingga pertumbuhan Mtb terhenti didalam granuloma dengan inti nekrosis kaseosa. Tahap keempat (imunitas seluler) dimulai ketika imunitas seluler yang diperantarai oleh limfosit T mengaktifkan makrofag dan menjaga integritas granuloma. Tahap kelima (nekrosis likuefaksi dan kavitas) dimulai jika daya tahan tubuh menurun, terjadi nekrosis likuefaksi di pusat granuloma yang mendukung pertumbuhan Mtb. Granuloma akan pecah, Mtb bisa mencapai jalan nafas dan beresiko penularan (Reinout *et al.*, 2002).



Gambar 2.2 Ilustrasi Patogenesis Tuberkulosis.

(Schlossberg D, 2011)

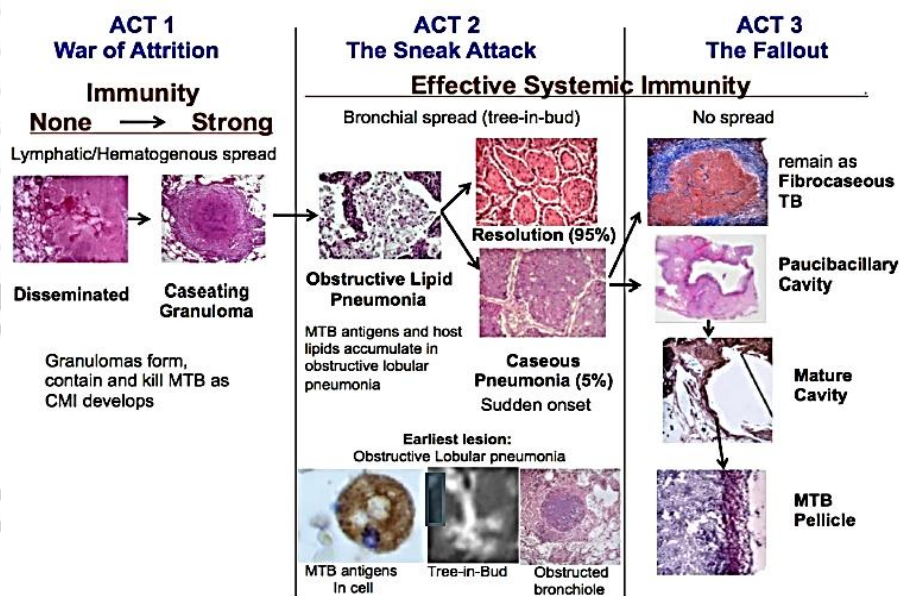
2.1.2 Patogenesis Tuberkulosis Post Primer

Konsep granuloma telah diterima selama beberapa lama sebagai konsep patogenesis tuberkulosis. Konsep ini berdasarkan temuan patologi pada model hewan yang diinfeksi Mtb dan menjelaskan infeksi primer Mtb. Selama ini, tidak ada model yang menjelaskan perjalanan alamiah infeksi Mtb pada jaringan manusia. Konsep granuloma ini tidak bisa menjawab beberapa pertanyaan mengenai infeksi post primer pada manusia seperti proteksi vaksin tuberkulosis, kerentanan tuberkulosis pada orang dewasa sehat, sifat lesi infeksi post primer dan lainnya (Lalvani et al., 2013; Hunter R L, 2016).

Hunter menjelaskan bahwa temuan patologi utama infeksi post primer adalah pneumonia lobaris obstruktif dan patogenesisnya terdiri dari tiga tahap dan bukannya suatu proses berkelanjutan dari suatu proses tunggal. Pernyataan ini berdasarkan dari temuan gambaran patologi dan CT scan jaringan paru manusia.

Patogenesis ini terdiri dari tahap 1 (*War of Attrition*), tahap 2 (*The Sneak Attack*)

dan tahap 3 (*The Fallout*). Patogenesis ini (Gambar 2.3) dianggap mampu menjelaskan patologi infeksi post primer dan menjawab beberapa pertanyaan mendasar tentang tuberkulosis (Hunter R L, 2016)



Gambar 2.3 Patogenesis Tuberkulosis Post Primer.

Tahap pertama menjelaskan multiplikasi Mtb dalam makrofag alveolar. Infeksi ini akan dihambat oleh makrofag dan imunitas seluler. Pada host immunokompromised, terjadi diseminasi melalui jalur limfogen atau hematogen. Pada host immunokompeten, infeksi ini akan berhenti membentuk granuloma namun masih menyisakan jumlah kecil Mtb sehingga terjadi tuberkulosis laten. Pada tahap kedua, infeksi Mtb terjadi secara asimtomatik, mulai di apek paru. Alveolar makrofag berubah menjadi "foam cell" dan bersama sel adiposit akan menyumbat bronkiolus sehingga menimbulkan pneumonia lobaris obstruktif. Kondisi ini sangat ideal bagi Mtb untuk melakukan replikasi sampai terjadi nekrosis kaseosa jaringan pneumonia tersebut. Pada tahap tiga, jaringan kaseosa tersebut dibatukkan ke jalan nafas dan meninggalkan kavitas. Dinding kavitas mengandung banyak neutrophil dan enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) yang semakin melemahkan kavitas

(Hunter R L, 2016)

2.1.3 Sistem Imun Bawaan pada Tuberkulosis

Pengenalan dan fagositosis merupakan tahap awal dari imunitas bawaan terhadap infeksi Mtb. Mtb akan dikenali oleh sel *Antigen Presenting Cell* (APC) yang kemudian akan mempresentasikan antigen ke sel limfosit dengan bantuan molekul *co-stimulator* dan sitokin. Sel dendrit dan makrofag alveolar merupakan

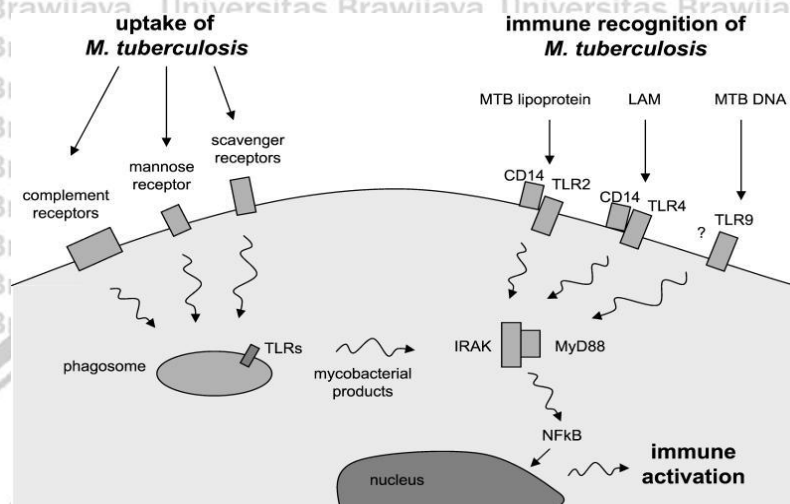
sel APC yang utama. Pengenalan Mtb merupakan interaksi dari PRR (*Pathogen Recognition Receptor*) yang dimiliki sel dendrit atau makrofag dengan PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) dari Mtb (North and Jung, 2004).

Banyak reseptor terdapat di permukaan makrofag untuk mengenali Mtb (Gambar 2.4). Reseptor komplemen untuk mengenali Mtb yang telah diopsonisasi sedangkan reseptor *mannose* dan reseptor *scavenger* untuk mengenali Mtb yang tidak teropsonisasi. Opsonisasi oleh komplemen C3 meningkatkan ikatan dan kemampuan pengenalan Mtb. Defisiensi reseptor CR3 mengurangi kemampuan pengenalan makrofag sebesar 70-80% (Reinout et al., 2002).

Toll Like Receptor (TLR) merupakan salah satu reseptor sel APC (*Antigen Presenting Cell*). TLR merupakan protein homologous pada membrane sel APC yang berfungsi sebagai reseptor fungsional yang mengaktifkan leukosit untuk menimbulkan respon imun bawaan atau respon inflamasi dalam melawan patogen. Reseptor ini terdiri dari daerah yang kaya dengan *leucine* pada ekstrasel dan pada region sitoplasma merupakan reseptor dari IL-1 dan IRAK (*IL-1R Associated Kinase*) yang akan mengaktifkan faktor transkripsi NFkB untuk memproduksi sitokin (Reinout et al., 2002).

TLR berperan penting dalam pengenalan Mtb. TLR akan mengenali komponen lipoprotein dan LAM dinding sel Mtb yang terlarut sehingga akan menginduksi IL-12 suatu sitokin pro inflamasi yang kuat. Aktivasi makrofag dimulai dengan proses signaling intraseluler melalui protein MyD88 (*Myeloid Differentiation Protein 88*) yang akan menghubungkan TLR dengan IRAK (proses ubiquitinisasi) sehingga terjadi aktivasi NFkB dan produksi sitokin pro inflamasi seperti IL-12, TNF- α dan IFN- γ . Beberapa Mtb dapat menghambat proses

ubiquitinisasi ini sehingga mampu bertahan dari sistem imun bawaan (Jing *et al.*, 2015).

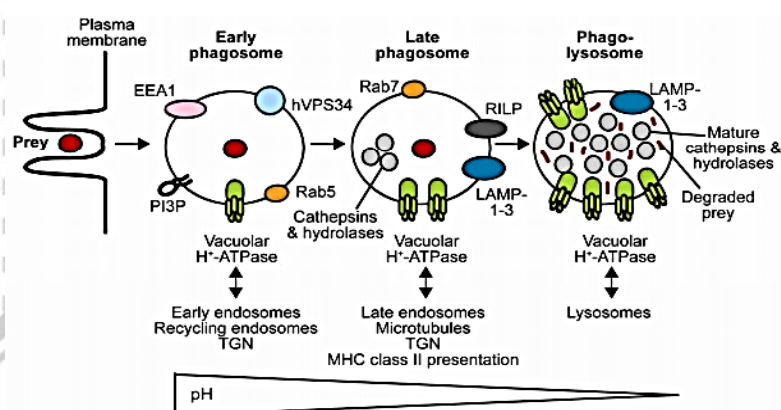


Gambar 2.4 Reseptor Permukaan Makrofag

(Reinout *et al.*, 2002)

Proses Fagositosis Mtb oleh makrofag dapat terjadi secara langsung atau tidak langsung. Secara langsung diantaranya melibatkan ikatan reseptor mannose dengan komponen peptidoglikan dan lipoprotein dari Mtb. Sementara proses fagositosis tidak langsung melibatkan ikatan Mtb yang telah teropsonisasi oleh komplemen dengan reseptor C3 dari makrofag. Fagosom yang berisi Mtb akan mengalami proses maturasi. Proses ini melibatkan fusi antara fagosom dengan beberapa endosome dan lisosom. Maturasi fagosom terdiri dari 3 tahap yaitu early, intermediate dan late fagosom dimana perbedaan ketiganya terletak pada komposisi protein dari membrane fagosom. Pada proses ini juga terjadi penurunan pH fagosom sebagai akibat dari aktivitas pompa H^+ -ATPase dan efluks ion metal seperti besi (Fe) dan mangan (Mn) melalui transporter ion diantaranya NRAMP-1 (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*). Fusi fagosom dan lisosom

mengakibatkan asidifikasi, aktivasi NADPH oksidase dan iNOS, pengeluaran ROS dan RNI sehingga terjadi proses *respiratory burst* yang akan membunuh Mtb (Gambar 2.5) (Welin A, 2011).



Gambar 2.5 Proses Pematuran Fagosit

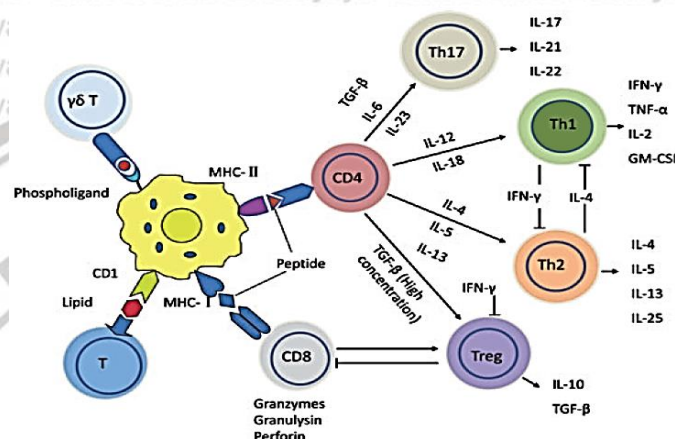
(Welin A, 2011)

Proses presentasi antigen Mtb ke sel T melibatkan proses spesifik. Molekul MHC class II (*Major Histocompatibility Molecule*) mengekspresikan antigen Mtb ke sel T CD4⁺ sementara molekul MHC class I mengekspresikan antigen Mtb ke sel T CD8⁺. Proses aktivasi sel T bisa berjalan sukses jika dibarengi dengan ikatan molekul *co stimulator* dan sitokin. Molekul *co stimulator* yang diketahui berperan adalah B-7.1 (CD80) dan B-7.1 (CD86). Sementara ikatan sitokin yang diketahui adalah antara IL-12, IL-18 dan IL-23 (Reinout *et al.*, 2002).

2.1.4 Sistem Imun Adaptif pada Tuberkulosis

Imunitas seluler infeksi Mtb rata-rata dimulai pada hari ke 8- 9 dari awal terjadinya infeksi. Sel APC pada mukosa jalan nafas menangkap antigen Mtb kemudian bermigrasi menuju limfonodi terdekat dan mempresentasikan antigen ke sel T naif. Sel T menjadi aktif kemudian berdiferensiasi menjadi sel T efektor

CD4⁺ dan CD8⁺ (Gambar 2.6) dan bermigrasi dari limfonodi menuju tempat terjadinya infeksi pada hari ke -18 sampai 20 pasca infeksi. Sel T CD4⁺ mengeluarkan sitokin diantaranya TGFβ, IL-6, IL-12, IL-4, IL-5, IL-13 sehingga berdiferensiasi menjadi Sel T *Helper* (Th) diantaranya Th1, Th2 dan Th17 (Dhedha *et al.*, 2010).



Gambar 2.6 Imunitas Adaptif Tuberkulosis

(Dhedha *et al.*, 2010)

Waktu yang diperlukan untuk munculnya imunitas seluler merupakan hal yang krusial dalam infeksi Mtb. Infeksi terjadi bersamaan dengan waktu diperlukan untuk mengawali imunitas seluler sehingga semakin lama terbentuknya imunitas seluler, beban infeksi Mtb semakin berat. Salah satu cara yang digunakan untuk mempercepat imunitas seluler adalah melalui vaksinasi (Cooper, 2009).

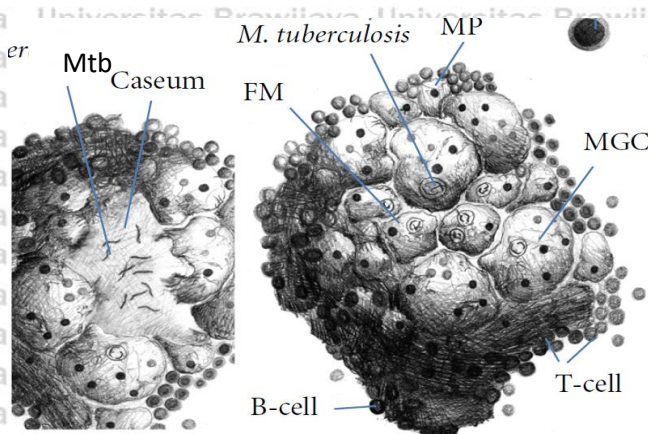
Vaksinasi BCG dapat meningkatkan respon kinetik imunitas seluler sehingga dapat melindungi anak dari penyebaran penyakit yang lebih luas namun tidak mampu mencegah infeksi pada orang dewasa. Penelitian menunjukkan bahwa vaksinasi BCG yang diberikan melalui aerosol mampu mempercepat imunitas seluler dan memberi perlindungan efektif terhadap Mtb hanya dalam beberapa hari. Selain itu, sel memori yang terbentuk banyak berada di sirkulasi

perifer dan tidak berkumpul di jaringan paru sehingga kemampuannya untuk bermigrasi tidak optimal jika terjadi infeksi di paru (Jung *et al.*, 2005).

Peranan interleukin 17 pada imunitas seluler infeksi Mtb masih belum jelas dipahami. Penelitian oleh Khader menemukan bahwa respon kinetik dari sel penghasil IFN γ sangat lambat pada tikus defisiensi IL-17. Selain itu, tikus defisiensi IL-17 dan IL-23 mengalami respon pembentukan granuloma dan aktivasi neutrofil yang sangat berkurang sehingga terjadi penyebaran Mtb yang cepat. Hal ini menimbulkan dugaan adanya pengaruh IL-17 didalam proses awal dari imunitas seluler (Khader *et al.*, 2007).

2.1.5 Pembentukan Granuloma

Granuloma merupakan ciri khas infeksi tuberkulosis. Granuloma merupakan struktur imun mikroskopis untuk mengendalikan infeksi tuberkulosis (Gambar 2.7) Namun, granuloma memberikan lingkungan yang ideal untuk kelangsungan hidup Mtb. Secara umum, keutuhan struktur granuloma ditentukan oleh keseimbangan antara aktivitas pro inflamasi dan anti inflamasi sistem imun tubuh. Granuloma terdiri dari makrofag, sel epiteloid, sel Datia Langhans, netrofil dan dikelilingi oleh limfosit T. Granuloma pengkejuan (kaseosa) merupakan sifat sebagian besar granuloma tuberkulosis yang terdiri dari inti nekrosis kaseosa yang dikelilingi sel epiteloid, foamy makrofag, datia langhans, limfosit T dan kadang neutrofil. Sitokin TNF- α dan IFN γ merupakan sitokin pro inflamasi utama pada granuloma sementara IL-10 merupakan sitokin anti inflamasi. Selain itu terdapat pula chemokine CCL2/MCP-1, CCL12 dan CCL13 yang berperan sebagai faktor kemotaktik untuk menarik monosit dan netrofil.



Gambar 2.7 Ilustrasi Granuloma Tuberkulosis.

Gambar kanan menampilkan granuloma tuberkulosis yang dikelilingi sel-sel imun sementara gambar kiri menampilkan Mtb didalam granuloma dengan inti nekrosis kaseosa. FM: *Foamy Macrophage*, MGC: *Multinucleated Giant Cell*.

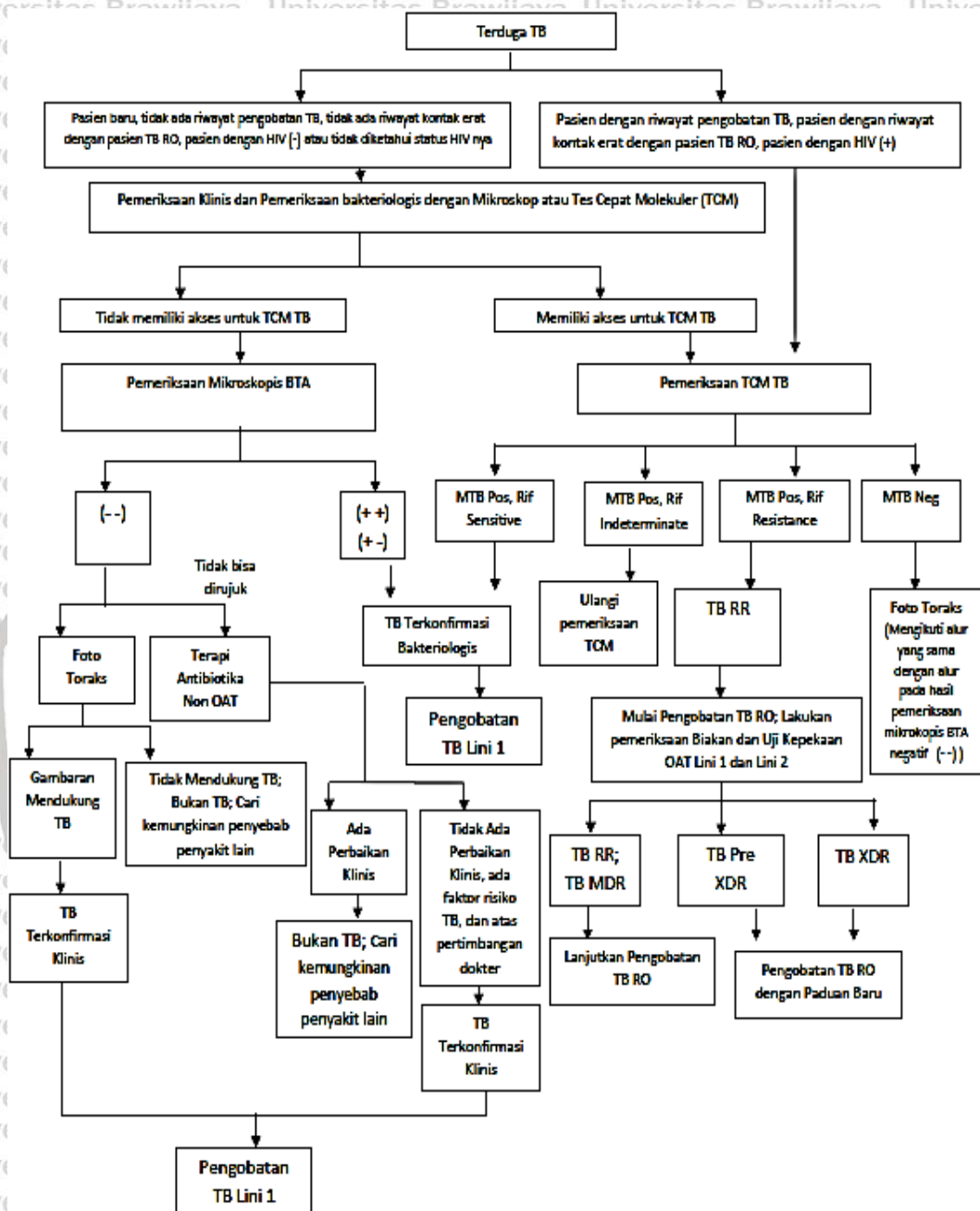
(Miranda *et al.*, 2012)

Neutrofil merupakan salah satu sel yang terlibat didalam granuloma. Sel ini dipercaya merupakan sel lini pertama untuk melawan Mtb. Sel ini diaktifkan secara langsung oleh fragmen *lipoarabinomannan* (LAM) dan IL-17. Neutrofil membantu membunuh Mtb dan mengawali proses inflamasi melalui sekresi MCP-1, CXCR3 dan IL-8 sehingga menarik lebih banyak leukosit, dan memperkuat struktur granuloma. Jika granuloma telah terbentuk, neutrofil tidak lagi berperan dan hanya kembali jika granuloma tersebut mengalami lisis (Miranda *et al.*, 2012)

2.1.6 Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa

Alur diagnosis TB dibagi sesuai dengan fasilitas yang tersedia:

- a. Faskes yang mempunyai akses pemeriksaan dengan alat tes cepat molekuler
- b. Faskes yang hanya mempunyai pemeriksaan mikroskopis dan tidak memiliki akses ke tes cepat molekuler.



Gambar 2.8 Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa

(Permenkes 67, 2016)

Prinsip penegakan diagnosis TB:

- Diagnosis TB Paru pada orang dewasa harus ditegakkan terlebih dahulu dengan pemeriksaan bakteriologis. Pemeriksaan bakteriologis yang dimaksud adalah pemeriksaan mikroskopis, tes cepat molekuler TB dan biakan.
- Pemeriksaan TCM digunakan untuk penegakan diagnosis TB, sedangkan pemantauan kemajuan pengobatan tetap dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopis.
- Tidak dibenarkan mendiagnosis TB hanya berdasarkan pemeriksaan foto toraks saja. Foto toraks tidak selalu memberikan gambaran yang spesifik pada TB paru, sehingga dapat menyebabkan terjadi *overdiagnosis* ataupun *underdiagnosis*.
- Tidak dibenarkan mendiagnosis TB dengan pemeriksaan serologis.

a. Faskes yang mempunyai Alat Tes Cepat Molekuler (TCM) TB:

- 1) Faskes yang mempunyai akses pemeriksaan TCM, penegakan diagnosis TB pada terduga TB dilakukan dengan pemeriksaan TCM. Pada kondisi dimana pemeriksaan TCM tidak memungkinkan (misalnya alat TCM melampaui kapasitas pemeriksaan, alat TCM mengalami kerusakan, dll), penegakan diagnosis TB dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopis.
- 2) Jika terduga TB adalah kelompok terduga TB RO dan terduga TB dengan HIV positif, harus tetap diupayakan untuk dilakukan penegakan diagnosis TB dengan TCM TB, dengan cara melakukan rujukan ke layanan tes cepat molekuler terdekat, baik dengan cara rujukan pasien atau rujukan contoh uji.

- 3) Jumlah contoh uji dahak yang diperlukan untuk pemeriksaan TCM sebanyak 2 (dua) dengan kualitas yang bagus. Satu contoh uji untuk diperiksa TCM, satu contoh uji untuk disimpan sementara dan akan diperiksa jika diperlukan (misalnya pada hasil indeterminate, pada hasil Rif Resistan pada terduga TB yang bukan kriteria terduga TB RO, pada hasil Rif Resistan untuk selanjutnya dahak dikirim ke Laboratorium LPA untuk pemeriksaan uji kepekaan Lini-2 dengan metode cepat)
- 4) Contoh uji non-dahak yang dapat diperiksa dengan MTB/RIF terdiri atas cairan serebrospinal (*Cerebro Spinal Fluid/CSF*), jaringan biopsi, bilasan lambung (*gastric lavage*), dan aspirasi cairan lambung (*gastric aspirate*).
- 5) Pasien dengan hasil Mtb Resistan Rifampisin tetapi bukan berasal dari kriteria terduga TB RO harus dilakukan pemeriksaan TCM ulang. Jika terdapat perbedaan hasil, maka hasil pemeriksaan TCM yang terakhir yang menjadi acuan tindakan selanjutnya.
- 6) Jika hasil TCM indeterminate, lakukan pemeriksaan TCM ulang. Jika hasil tetap sama, berikan pengobatan TB Lini 1, lakukan biakan dan uji kepekaan.
- 7) Pengobatan standar TB MDR segera diberikan kepada semua pasien TB RR, tanpa menunggu hasil pemeriksaan uji kepekaan OAT lini 1 dan lini 2 keluar. Jika hasil resistensi menunjukkan MDR, lanjutkan pengobatan TB MDR. Bila ada tambahan resistensi terhadap OAT lainnya, pengobatan harus disesuaikan dengan hasil uji kepekaan OAT.
- 8) Pemeriksaan uji kepekaan menggunakan metode LPA (*Line Probe Assay*) Lini-2 atau dengan metode konvensional

9) Pengobatan TB pre XDR/ TB XDR menggunakan paduan standar TB pre XDR atau TB XDR atau menggunakan paduan obat baru.

10) Pasien dengan hasil TCM M.tb negatif, lakukan pemeriksaan foto toraks. Jika gambaran foto toraks mendukung TB dan atas pertimbangan dokter, pasien dapat didiagnosis sebagai pasien TB terkonfirmasi klinis. Jika gambaran foto toraks tidak mendukung TB kemungkinan bukan TB, dicari kemungkinan penyebab lain.

b. Faskes yang tidak mempunyai Alat Tes Cepat Molukuler (TCM) TB

- 1) Faskes yang tidak mempunyai alat TCM dan kesulitan mengakses TCM, penegakan diagnosis TB tetap menggunakan mikroskop.
- 2) Jumlah contoh uji dahak untuk pemeriksaan mikroskop sebanyak 2 (dua) dengan kualitas yang bagus. Contoh uji dapat berasal dari dahak Sewaktu-Sewaktu atau Sewaktu-Pagi.
- 3) BTA (+) adalah jika salah satu atau kedua contoh uji dahak menunjukkan hasil pemeriksaan BTA positif. Pasien yang menunjukkan hasil BTA (+) pada pemeriksaan dahak pertama, pasien dapat segera ditegakkan sebagai pasien dengan BTA (+)
- 4) BTA (-) adalah jika kedua contoh uji dahak menunjukkan hasil BTA negatif. Apabila pemeriksaan secara mikroskopis hasilnya negatif, maka penegakan diagnosis TB dapat dilakukan secara klinis menggunakan hasil pemeriksaan klinis dan penunjang (setidak-tidaknya pemeriksaan foto toraks) yang sesuai dan ditetapkan oleh dokter.
- 5) Apabila pemeriksaan secara mikroskopis hasilnya negatif dan tidak memiliki akses rujukan (radiologi/TCM/biakan) maka dilakukan pemberian

terapi antibiotika spektrum luas (Non OAT dan Non kuinolon) terlebih dahulu selama 1-2 minggu. Jika tidak ada perbaikan klinis setelah pemberian antibiotik, pasien perlu dikaji faktor risiko TB. Pasien dengan faktor risiko TB tinggi maka pasien dapat didiagnosis sebagai TB Klinis.

Faktor risiko TB yang dimaksud antara lain:

- a) Terbukti ada kontak dengan pasien TB
- b) Ada penyakit komorbid: HIV, DM
- c) Tinggal di wilayah berisiko TB: Lapas/Rutan, tempat penampungan pengungsi, daerah kumuh, dll.

2.2 Tuberkulosis Resisten Obat

2.2.1 Definisi

Tuberkulosis Resisten Obat (TB RO) adalah dimana *Mycobacterium tuberculosis* sudah tidak dapat lagi dibunuh dengan obat anti tuberkulosis (OAT).

Terdapat lima kategori dari TB RO diantaranya Monoresistance, Polyresistance, Multi Drug Resistance (MDR), Extensively Drug Resistance (XDR) dan TB Resisten Rifampicin (TB RR) (PMTPTRO, 2014).

2.2.2 Resistensi *Mycobacterium Tuberculosis*

Faktor utama sebagai penyebab terjadinya resistensi *Mtb* terhadap OAT adalah ulah manusia sebagai akibat tatalaksana pengobatan TB yang tidak tepat dilaksanakan dengan baik. Penatalaksanaan TB yang tidak adekuat ditinjau dari sisi petugas kesehatan diantaranya salah mendiagnosis TB, pengobatan tidak menggunakan panduan yang tepat, dosis yang tidak adekuat dan penyuluhan

yang kurang. Dari sisi pasien yaitu tidak teratur menelan obat, menghentikan pengobatan secara sepihak dan gangguan penyerapan obat. Dari sisi program diantaranya kualitas obat yang buruk dan persediaan OAT yang sedikit (PMTPTRO, 2014).

Resistensi Mtb terhadap OAT tidak sepenuhnya akibat ulah manusia.

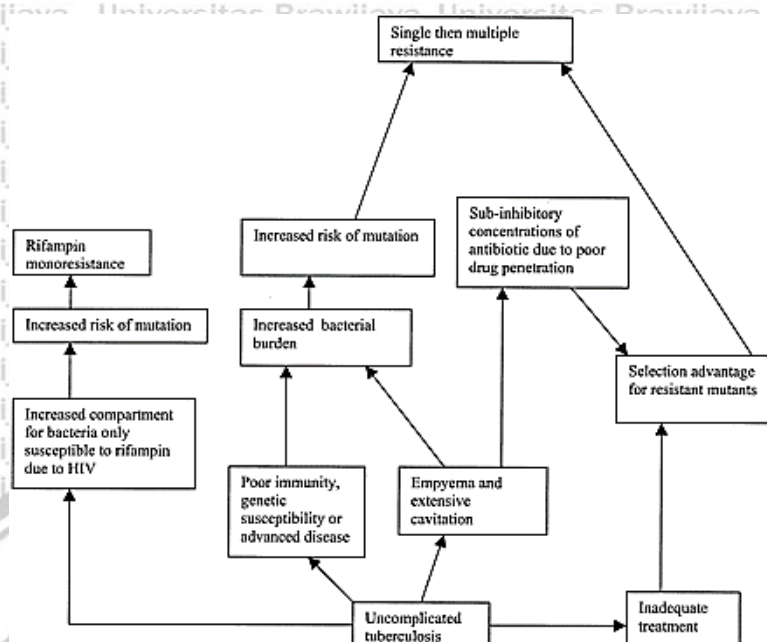
Faktor virulensi Mtb itu sendiri juga mempengaruhi. M tuberculosis genotip Beijing merupakan salah satu jenis Mtb yang ganas. Genotip Beijing pertama kali diisolasi tahun 1995 dan dihubungkan dengan penyebaran TB MDR di Amerika Serikat.

Genotip ini diperkirakan jenis "*hypervirulence*" yang diduga hasil mutasi yang lolos dari pemberian vaksinasi M bovis (Caws *et al.*, 2006). Di Indonesia penyebaran genotip Beijing terbanyak di Indonesia bagian barat dan tengah, sementara di Indonesia timur didominasi oleh genotip *East-India-Africa* yang kurang virulen. Di Indonesia, genotip ini juga dihubungkan dengan kegagalan terapi pengobatan OAT dan TB MDR (Parwati *et al.*, 2010; Lisdawati *et al.*, 2015). Selain genotip Beijing, genotip lain yang berhubungan dengan kegagalan terapi OAT dan TB MDR adalah genotip S256 yang tersebar di negara negara pecahan Uni Soviet dan Asia Tengah (Zhdanova *et al.*, 2013).

Tingginya jumlah kuman Mtb menyebabkan resiko terjadinya mutasi spontan. Mutasi ini bahkan bisa terjadi sebelum terpapar olah pengobatan anti tuberkulosis. Pada Mtb, resistensi obat muncul secara genetik melalui mutasi kromosom yang sebagian besar berupa *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) atau polimorfisme nukleotida tunggal. Secara umum, mutasi muncul secara spontan sebagai akibat kesalahan pada replikasi DNA dengan laju satu mutasi setiap 10.000 – 100.000 pasangan basa DNA pada setiap replikasi (McGrath *et al.*, 2014).

Secara *in vitro*, sebenarnya Mtb memiliki laju mutasi yang rendah dengan genom yang relative stabil jika dibandingkan dengan bakteri lainnya seperti E Coli. Kondisi yang berbeda ditemukan pada kondisi *in vivo*, dimana mutasi Mtb sangat tergantung dari jumlah replikasi. Semakin banyak replikasi, semakin tinggi angka mutasi pada Mtb. Untuk memunculkan resistensi terhadap isoniazid dan rifampisin (TB MDR) setidaknya harus terdapat 10^6 basil Mtb sebelum dimulainya suatu pengobatan. Pada fase kronis, terjadi pembentukan granuloma untuk membatasi penyebaran Mtb. Di dalam granuloma, sistem imun yang adekuat berhasil mengendahkan populasi Mtb dan terjadi keseimbangan antara pertumbuhan dan pembunuhan Mtb. Namun yang perlu diingat adalah terjadinya mutasi tergantung dari jumlah replikasi, sehingga walaupun sudah terbentuk granuloma, kemungkinan terjadinya mutasi masih tetap ada (Colijn *et al.*, 2011; McGrath *et al.*, 2014).

Beberapa faktor lain berhubungan dengan kemungkinan terjadinya peningkatan populasi Mtb sehingga meningkatkan terjadinya mutasi dan resistensi (Gambar 2.9). Penurunan sistem imun dan kerentanan genetik akan menyebabkan peningkatan populasi Mtb. Adanya kavitas, pus atau empyema akan menyebabkan kondisi ideal untuk pertumbuhan Mtb. Kepatuhan terhadap pengobatan, dosis OAT yang tidak optimal dan malabsorpsi OAT juga meningkatkan populasi Mtb (Gillespie, 2002).



Gambar 2.9 Skema Terjadinya Resistensi *Mycobacterium Tuberculosis*.

(Gillespie, 2002)

2.2.3 Faktor Resiko Tuberkulosis Resisten Obat

2.2.3.1 Genetik

Polimorfisme genetik *host* menentukan kerentanan seseorang terhadap infeksi tuberkulosis. Hal ini dapat menjelaskan mengapa ada beberapa orang yang tahan terhadap infeksi TB sementara yang lainnya mudah menderita sakit TB. Di tingkat populasi, faktor genetik ini dapat menjawab perbedaan tingkat kerentanan terhadap infeksi TB pada ras-ras tertentu. Perkembangan kemajuan ilmu genetika dan biologi molekuler memungkinkan pemeriksaan polimorfisme untuk dilakukan.

Oleh karena itu, polimorfisme genetik mempengaruhi respon awal seseorang terhadap infeksi dan akan menentukan respon selanjutnya dari infeksi tuberkulosis (Cadena *et al.*, 2016).

Polimorfisme gen yang bertanggung jawab terhadap sistem imun baik imunitas bawaan ataupun imunitas seluler telah diperiksa untuk menentukan kerentanan genetik terhadap TB MDR. HLA merupakan salah satu pembeda pada proses pengenalan protein *self* atau *non self* sementara NLRP1 merupakan molekul pengangkut ion di permukaan fagolisosom. Keduanya diketahui berperan dalam pengenalan dan fagositosis Mtb. Polimorfisme gen HLA DRB1, NLRP1 telah dilakukan dengan hasil yang sesuai dengan TB MDR. Interleukin 2, IL-4 dan IL-10 diketahui berperan didalam imunitas seluler. Peranan interleukin ini didalam infeksi tuberkulosis sudah diketahui. Polimorfisme interleukin 2, IL-4, dan IL-10 juga telah diperiksa di beberapa negara dengan hasil konsisten dengan TB MDR (Butov *et al.*, 2016; Vasantha *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2003). Sel Th 17 merupakan sumber utama IL 17 namun beberapa sel imun bawaan diketahui dapat mensekresikan IL 17. Interleukin 17 berperan dalam infeksi awal Mtb, pembentukan granuloma, penarikan sel neutrofil dan optimalisasi respon sel Th1 (Torrado and Cooper, 2010). Pemeriksaan polimorfisme interleukin ini juga telah dilakukan di beberapa negara namun hasilnya tidak sesuai (Peng *et al.*, 2013).

2.2.3.2 Penurunan Kekebalan Tubuh

Infeksi HIV berhubungan dengan peningkatan resiko terjadinya TB MDR. Suatu penelitian meta analisa tahun 2014 menyebutkan Infeksi HIV akan meningkatkan resiko terjadinya TB MDR sebesar 24% (Mesfin *et al.*, 2014). Beberapa hipotesis yang menjelaskan hubungan antara infeksi HIV dengan TB MDR diantaranya : 1) Pasien dengan penurunan sistem imun sangat rentan terhadap infeksi Mtb walaupun jenis yang kurang virulen. 2) Manifestasi penyakit TB MDR muncul lebih awal pada infeksi HIV karena mudah terjadi progresifitas

penyakit. 3) Terdapat faktor resiko yang sama diantara TB MDR dan infeksi HIV.

4) Pasien TB dengan infeksi HIV memiliki beban dan populasi Mtb yang besar sehingga beresiko tinggi terhadap mutasi spontan. 5) Pada infeksi HIV, terjadi malabsorpsi obat OAT sehingga terjadi terapi TB yang kurang optimal (Sergeev *et al.*, 2012).

Beberapa studi epidemiologi menyebutkan hubungan antara diabetes mellitus dengan tuberkulosis. Pasien diabetes mempunyai resiko tiga kali lebih besar terkena tuberkulosis paru (Hodgson *et al.*, 2015). Kondisi diabetes juga menurunkan laju konversi sputum pada pasien TB MDR (Salindri *et al.*, 2016).

Diabetes mellitus merubah perjalanan penyakit tuberkulosis dimana lebih beresiko untuk terjadinya reaktivasi TB laten, kegagalan terapi dan kematian. Pada tingkat seluler, diabetes mengurangi fungsi fagositosis makrofag, gangguan opsonisasi, penurunan respon kemotaksis sel radang dan gangguan presentasi antigen oleh sel APC (Restrepo and Schlesinger, 2014).

Pada kondisi gagal ginjal kronik stadium lanjut terjadi imunodefisiensi. Kondisi imunodefisiensi ini dihubungkan dengan tingkat oksidatif yang tinggi, defisiensi vitamin D dan malnutrisi. Kondisi tersebut akan menurunkan fungsi sel limfosit T dan limfosit B. Selain itu, pasien penerima transplantasi ginjal akan menerima obat penekan sistem imun sehingga berpotensi terjadi reaktivasi tuberkulosis (Romanowski *et al.*, 2016).

2.2.3.3 Pengobatan Tidak Adekuat

Pengobatan tuberkulosis yang tidak adekuat bisa terjadi dari segi kepatuhan pasien, absorpsi obat yang lemah, dosis dan regimen obat yang tidak tepat. Pengobatan tuberkulosis menerapkan prinsip *prolonged, combined and*

continued. Durasi pengobatan standar tuberkulosis terdiri dari 2 bulan fase intensif dan 4 bulan fase lanjutan. Durasi yang lama akan mempengaruhi tingkat kepatuhan pasien. Beberapa faktor yang mempengaruhi kepatuhan pasien diantaranya tingkat pendidikan pasien, kondisi sosio kultural dan dukungan keluarga (Pasek *et al.*, 2013).

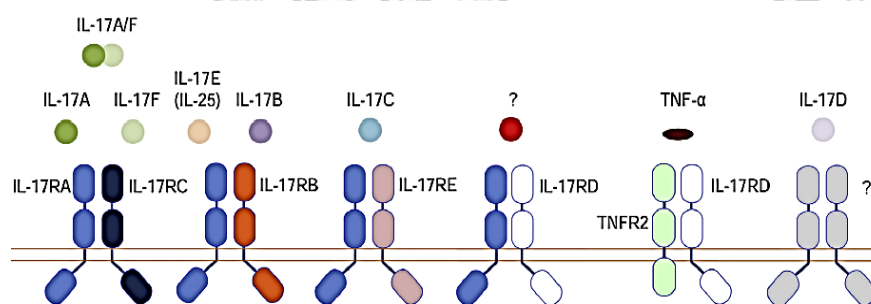
Penggunaan OAT seharusnya dalam bentuk kombinasi beberapa obat dengan mekanisme yang berbeda. Isoniazid (H) memiliki aktivitas bakterisidal dan secara cepat membunuh Mtb di kavitas. Rifampisin (R) penting untuk membunuh Mtb yang memiliki metabolisme lambat, membunuh kuman persister dan sterilisasi sputum. Pirazinamid (Z) aktif membunuh Mtb yang berlokasi di pusat nekrosis kaseosa dengan pH asam (Gillespie, 2002). Fenomena "*fall and rise*" menjelaskan penggunaan monoterapi yang pada awalnya mampu menekan pertumbuhan kuman Mtb, namun beberapa kuman yang bertahan menjadi resisten terhadap obat tersebut dan terus tumbuh (Pinto *and* Menzies, 2011).

2.3 Interleukin 17

Interleukin 17 (IL-17) pertama kali diidentifikasi pada tahun 1993 dan awalnya dikenal dengan *Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 8* (CTLA- 8). Interleukin 17 diketahui mempunyai peran penting didalam proses patologi dalam tubuh. Pada sistem respirasi, IL-17 berperan didalam proses infeksi fase akut dan fase kronis serta bersifat sebagai sitokin pro inflamasi (Lyadova *and* Panteleev, 2015; Lore *et al.*, 2016).

2.3.1 Struktur Interleukin 17

Terdapat enam jenis IL-17 yang telah diketahui, diantaranya IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, dan IL-17F (Gambar 2.10). Semua ligan IL-17 bersifat homodimer walaupun saat ini telah diketahui ligan heterodimer yaitu IL-17A/IL-17F. Sekuensing asam amino dari IL-17C, IL-17B dan IL-17D berbeda dengan IL-17A dan IL-17F sehingga kemungkinan dapat digolongkan kedalam sub kelas yang berbeda. IL-17A dan IL-17F memiliki fungsi pro inflamasi yang diperantarai neutrofil sementara IL-17E bersifat sebagai mediator sel Th2. IL-17C dan IL-17D ditemukan di jaringan paru namun fungsinya masih belum jelas sementara IL-17B tidak ditemukan di jaringan paru. Reseptor untuk IL-17 ada 5 jenis baik yang bersifat homodimer ataupun heterodimer. IL-17RA dan IL-17RC bersifat heterodimer untuk menangkap sinyal dari IL-17A dan IL-17F. Reseptor IL-17 banyak ditemukan pada sel Dendrit, Makrofag, Limfosit, Keratinosit, Sel Epitelial dan Fibroblast.



Gambar 2.10 Interleukin 17 dan Reseptornya

(Lore *et al.*, 2016)

Ekspresi sub tipe dari interleukin 17 diatur oleh gen yang terletak pada berbagai kromosom (Tabel 2.1). Gen yang mengatur Interleukin 17A dan IL 17F terletak pada kromosom 6p12. Meskipun terletak pada kromosom yang sama dan

memiliki struktur yang hampir homolog, namun kadang fungsi diantara kedua interleukin ini dapat saling bertolak belakang tergantung dari jenis dan lokasi dari penyakit. Pada kasus autoimun encephalitis, IL 17A berkontribusi terhadap keparahan penyakit namun tidak untuk IL 17F. Sifat pro inflamasi juga diperlihatkan oleh IL 17A pada kasus asma yaitu sebagai mediator penarikan eosinofil sedangkan IL 17F bersifat menekan inflamasi eosinofil. Pada kasus colitis akut, IL 17A bersifat protektif, sedangkan IL 17F lebih bersifat patogenik (Jin and Dong, 2013).

Tabel 2.1 Karakteristik Interleukin 17

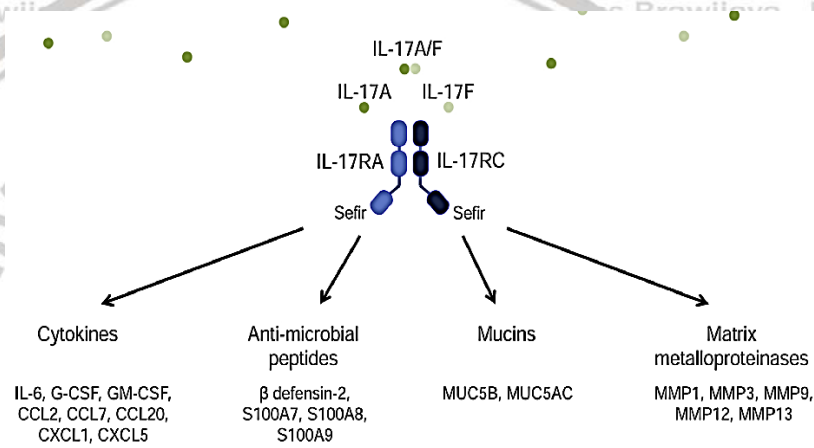
Sub tipe IL17	Ukuran (kDa)	Panjang (jumlah genotip AA)	Lokasi Kromosom	Homolog murin human
A	35	155	6p12	62
B	41	180	5q32-34	88
C	40	197	16q24	83
D	52	202	13q12.11	78
E	34	161	14q11.2	81
F	44	153	6p12	77

(Kolls and Linden, 2004)

2.3.2 Biologi Interleukin 17

Sel Th 17 diketahui sebagai sel utama yang menghasilkan IL-17. Beberapa penelitian terbaru menunjukan bahwa terdapat populasi sel lain yang dapat menghasilkan IL-17 diantaranya Neutrofil, Makrofag, sel T $\gamma\delta$, dan Invariant Natural Killer T Cell (iNKT) walaupun peranannya belum dapat diklarifikasi. Aksis IL-17 dan IL-17R berperan dalam modulasi sistem imun sistem respirasi pada infeksi akut maupun kronis. Aktivasi aksis tersebut akan mengaktifkan signaling intraseluler melalui domain "Safir" sehingga mengawali kaskade yang mengaktifkan berbagai faktor transkripsi seperti NFkB, *Mitogen – Activated Protein*

(MAP) dan *Phosphoinositide-3 Kinase* (PI3K). Aktivasi berbagai jalur tersebut mengakibatkan protein yang dihasilkan sangat beragam dan sulit diprediksi (Gambar 2.11). Sebagai hasil akhirnya adalah pembentukan berbagai sitokin dan *chemokine* pro inflamasi yang mempunyai fungsi yang berbeda seperti IL-6, G-CSF, GM-CSF, CCL2, CXCL1, β -Defensin, Mucin dan Matrix Metalloproteinase (MMP) (Lore *et al.*, 2016).



Gambar 2.11 Aksis IL-17/IL-17R

(Lore *et al.*, 2016)

Diferensiasi sel Th 17 tergantung pada TGF- β , IL-6 dan IL-23. Peranan sitokin tersebut berbeda setiap spesies. Pada tikus, diperlukan IL-6, TGF- β , IL-23, IL-1 β dan TNF- α untuk diferensiasi sel Th17. Sedangkan pada manusia diferensiasi sel Th17 memerlukan IL-6, IL-23, IL-1 β . Fungsi TGF- β tidak termasuk karena TGF- β erat kaitannya dengan pembentukan sel Treg dimana Treg akan menghambat sel Th 17. Sementara sitokin lain yang menghambat proliferasi sel Th17 adalah IFN- γ , IL-12, IL27, IL-4, and IL-2 (Lyadova and Panteleev, 2015).

Fungsi utama IL-17 adalah aktivasi dan rekrutment neutrofil, stimulasi diferensiasi sel granulosit dan mendukung proses inflamasi. Kemampuan aktivasi

dan rekrutmen neutrofil diperoleh karena IL-17 merangsang pengeluaran chemokine CXCL8 sedangkan kemampuan diferensiasi sel turunan granulosit diperoleh karena IL-17 merangsang G-CSF dan GM-CSF.

Kadar interleukin 17 pada beberapa organ masih belum banyak diteliti.

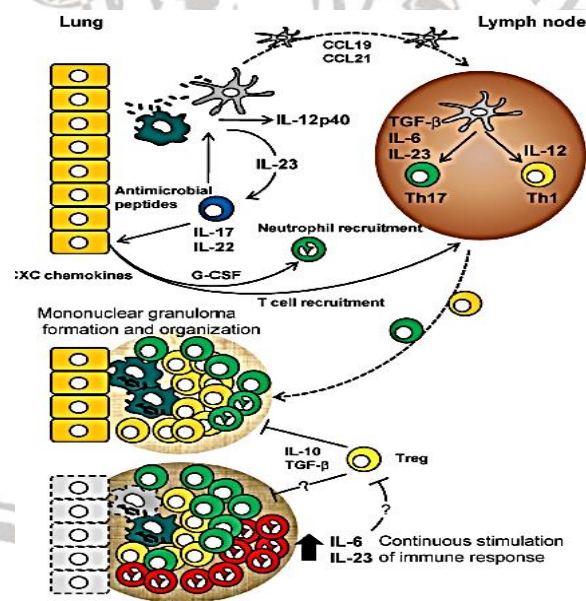
Penelitian oleh Dheda dkk membuktikan bahwa ekspresi mRNA IL-17 cairan BAL dan darah tepi pada pasien tuberkulosis paru tidak berbeda secara signifikan namun ekspresi mRNA IL-23 lebih tinggi pada BAL daripada darah tepi. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi sekuestrasi IL-23 pada paru pasien dengan tuberkulosis paru (Dheda *et al.*, 2008).

2.3.3 Interleukin 17 pada Tuberkulosis

Pada awalnya, interleukin 17 diketahui merupakan sitokin pro inflamasi yang terlibat pada proses infeksi bakteri ekstraseluler. Sitokin ini juga telah lama diteliti pada proses autoimun dan infeksi kronis. Sebagai sitokin pro inflamasi, IL-17 akan merekrut netrofil dan sel inflamasi lainnya sehingga dapat mengeliminasi infeksi. Namun aktivitas berlebih dari IL-17 dikatakan memberikan efek yang berbahaya karena menimbulkan kerusakan jaringan yang luas. Pada infeksi kronis bakteri intraseluler seperti tuberkulosis, peranan IL-17 masih tidak sejelas pada infeksi ekstraseluler dan diperlukan suatu keseimbangan antara aktivitas sitokin pro dan anti inflamasi untuk mengontrol infeksi tanpa menimbulkan kerusakan jaringan yang luas (Torrado *and* Cooper, 2010).

Penelitian terbaru pada tikus menunjukkan IL-17 membantu meningkatkan kapasitas sistem imun terhadap Mtb. Pada awal infeksi IL-17 dihasilkan oleh sel sistem imun bawaan dan berfungsi sebagai mediator awal inflamasi dan menarik sel inflamasi ke tempat terjadinya infeksi. Sel Dendrit atau makrofag kemudian

mempresentasikan antigen ke sel T naif di limfonodi. Melalui stimulasi sitokin IL-6, IL-23 dan TGF β , akan berdiferensiasi menjadi sel Th 17, sementara stimulasi IL-12 akan menjadi Th 1. Sel Th 17 akan mensekresikan IL-17 yang akan menyebabkan pembentukan granuloma mononuclear, rekrutmen neutrofil dan sel radang lainnya. Ketika infeksi menjadi kronis, paparan terlalu lama oleh IL-6 dan IL-23 akan menyebabkan semakin banyaknya sel penghasil IL-17 terakumulasi dan terjadi kerusakan jaringan normal disekitarnya (Gambar 2.12). Fungsi IL-17 akan dihambat oleh sel Treg melalui IL-10 dan TGF β . Interleukin 17 ini juga akan dihambat oleh IFN γ yang dihasilkan Th1. Pada infeksi kronis, dibutuhkan keseimbangan antara aktivitas Th 17, Th 1 dan Treg.



Gambar 2.12 Peranan IL-17 pada Tuberkulosis

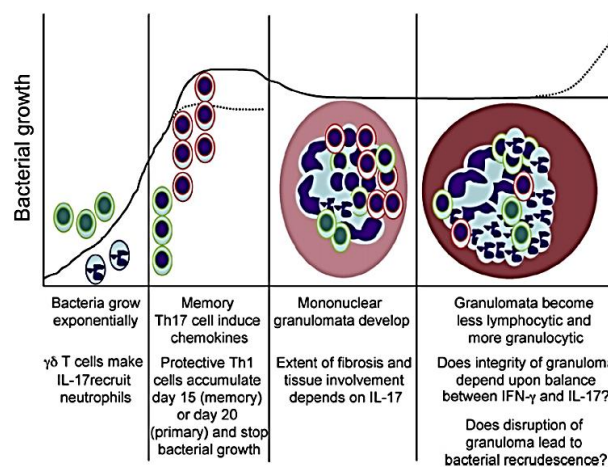
(Torrado and Cooper, 2010)

Interaksi IL-17 dan IL-23 berperan pada proses imunopatologi tuberkulosis.

Defisiensi IL-23 akan menurunkan respon sel Th 17. Pada awal infeksi, IL-17 dihasilkan oleh sel imun bawaan akan merekrut neutrofil ke tempat terjadinya

infeksi dan membentuk granuloma mononuclear sebagai respon awal tubuh.

Respon IL-17 terjadi lebih cepat pada tikus yang divaksinasi dibandingkan dengan tanpa vaksinasi (Gambar 2.13). Respon imun seluler oleh sel Th 1 akan mengeluarkan IL-12 dan IFN γ membantu membatasi infeksi. Respon sel Th1 akan berkurang jika tidak ada IL-17. Selain meningkatkan respon sel Th1, interleukin 17 juga akan menarik neutrofil dan monosit ke dalam granuloma. Pada infeksi kronis, interleukin 17 akan menjaga integritas granuloma dan mengurangi kematian neutrofil. Tidak adanya respon Th17 menyebabkan rapuhnya granuloma dan terjadi penyebaran Mtb. Oleh karena itu, keseimbangan respon imunitas seluler Th1 dan Th17 penting untuk menjaga integritas granuloma (Khader *and* Cooper, 2008)



Gambar 2.13 IL-17 Menginduksi Pembentukan Granuloma

Interleukin 17 yang dihasilkan oleh sel T y δ (imun bawaan) merespon awal infeksi Mtb. Sel memori Th17 akan mempercepat reaksi sel Th1 sehingga terbentuk granuloma. Karena pengaruh IL-17, granuloma menjadi bersifat granulosit dan berpotensi merusak jaringan sekitar. Namun, kurangnya respon IL-17 menyebabkan integritas granuloma mudah rusak. Aktivitas IL-17 yang berlebihan akan dihambat oleh IFN γ yang dihasilkan oleh sel Th1. Keseimbangan sel Th1 dan Th17 berperan dalam integritas granuloma.

(Khader *and* Cooper, 2008)

2.4 Polimorfisme

Gen adalah materi genetik yang diwariskan dari orangtua ke anaknya dalam proses reproduksi, dapat mempengaruhi satu atau lebih sifat yang diwariskan. Dalam sel, gen terletak didalam kromosom. Setiap sel reproduksi manusia memiliki 23 kromosom dengan 3×10^9 pasang basa DNA. Setiap kromosom memiliki sekitar 3500 gen. Posisi dari gen dalam kromosom disebut sebagai lokus. Dilihat dari struktur DNA, gen adalah unit molekul DNA atau RNA dengan panjang minimum tertentu yang membawa informasi mengenai urutan asam amino yang lengkap suatu protein atau molekul mRNA (Yuwono, 2005).

Panjang urutan pasangan nukleotida yang menyusun sebuah gen berbeda beda. Gen mengkode interleukin 17 terletak pada kromosom 6 p12 yang terdiri dari 1874 pasangan basa nukleotida. Bentuk alternatif dari sebuah gen yang terletak pada lokus tertentu pada kromosom tunggal disebut alel dari gen. (Hartl, 2005; Yuwono 2005).

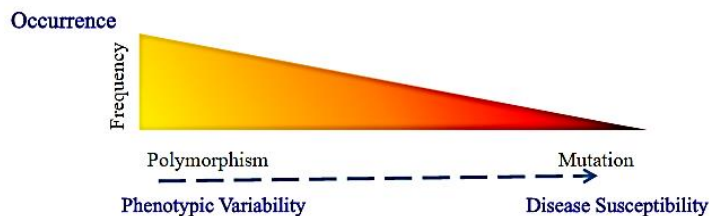
Secara umum struktur lengkap gen pada eukariota terdiri dari tiga bagian utama yaitu promoter, bagian struktural (*coding region*) dan terminator. Promoter adalah bagian gen yang berfungsi sebagai pengatur proses ekspresi genetik. Bagian ini akan dikenali pertama kali oleh RNA polymerase dan protein regulator sebelum proses transkripsi. Bagian struktural adalah bagian gen yang membawa kode genetik yang akan ditranskripsi dan kemudian ditranslasi. Bagian struktural terdiri dari ekson dan intron. Ekson adalah bagian sekuen nukleotida yang akan diterjemahkan (mengkode informasi genetik) sementara intron adalah bagian nukleotida yang tidak diterjemahkan (tidak mengkode informasi genetik). Intron mengalami proses transkripsi namun tidak akan ditranslasi. Suatu mutasi atau polimorfisme pada daerah ekson akan menyebabkan perbedaan sintesa protein.

Terminator adalah bagian gen yang berperan dalam proses penghentian transkripsi (Yuwono, 2005; Fatchiyah dkk., 2011).

Pada proses pembelahan sel, terjadi duplikasi DNA dengan bantuan enzim DNA polymerase. Proses duplikasi ini sangat teliti, namun terkadang terjadi kesalahan satu atau beberapa nukleotida. Perbedaan nukleotida akan menyebabkan perbedaan sintesa protein yang dihasilkan sehingga menyebabkan variasi genetik. Variasi genetik, dalam bentuk alel multipel dari gen, terdapat secara alami di populasi. Perbedaan genetik antar individu itu disebut sebagai polimorfisme (secara harafiah berarti bentuk bermacam-macam) DNA. Polimorfisme ini dapat menyandi protein yang berbeda dan menimbulkan genotip (sifat fisik atau biokimia) yang berbeda. Terkadang polimorfisme dapat menjelaskan sebagian kenapa beberapa orang dapat menangkal infeksi lebih baik dibandingkan orang lain. (Hartl, 2005)

Sebuah mutasi genetik didefinisikan sebagai perubahan dalam urutan DNA yang jauh menyimpang dari normal. Hal ini berarti terdapat alele normal yang lazim dalam populasi dan bahwa perubahan mutasi ini merupakan varian langka dan bersifat abnormal. Sebaliknya, polimorfisme adalah variasi urutan DNA yang umum di populasi. Dalam hal ini tidak ada alel tunggal dianggap sebagai urutan standar. Sebaliknya ada dua atau lebih alele alternatif yang bisa diterima. Batas frekuensi kejadian antara mutasi dan polimorfisme adalah 1 persen. Artinya, untuk digolongkan sebagai polimorfisme, alel paling umum harus memiliki frekuensi 1 persen atau lebih dalam populasi. Jika frekuensi frekuensinya kurang dari 1 persen, alel ini dianggap sebagai mutasi (Gambar 2.14). Mutasi terjadi sebagai akibat dari kerusakan DNA, kegagalan proses perbaikan DNA dan kesalahan dalam proses replikasi. Berbeda dengan mutasi, polimorfisme tidak menyebabkan

suatu penyakit namun hanya mempengaruhi tingkat kerentanan terhadap suatu penyakit yang merupakan bagian dari suatu variasi genetik didalam populasi (Karki *et al.*, 2015)



Gambar 2.14 Spektrum Klinis Polimorfisme dan Mutasi Genetik

(Karki *et al.*, 2015)

2.4.1 Deletion/Insertion Polymorphism

Terdapat bermacam macam polimorfisme DNA yang telah diketahui diantaranya Deletion/Insertion Polymorphism (DIP), Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Microsatellites Polymorphism. Polimorfisme DIP merupakan variasi genetik dimana terjadi penambahan (*insertion*) atau pengurangan (*deletion*) dari nukleotida yang spesifik (Gambar 2.15). Angka kejadian DIP sangat jarang dibandingkan dengan SNP. Polimorfisme DIP melebihi kelipatan tiga nukleotida akan menjadikan kecenderungan menjadi suatu mutasi karena akan mengubah kerangka format suatu DNA dan akan diturunkan seterusnya. Polimorfisme DIP kelipatan tiga nukleotida akan menghasilkan penambahan atau pengurangan dari asam amino yang dihasilkan namun tidak merubah asam amino asal (Murilo and Salem, 2013).



Gambar 2.15 Deletion/Insertion Polymorphism (DIP)

(Murilo and Salem, 2013)

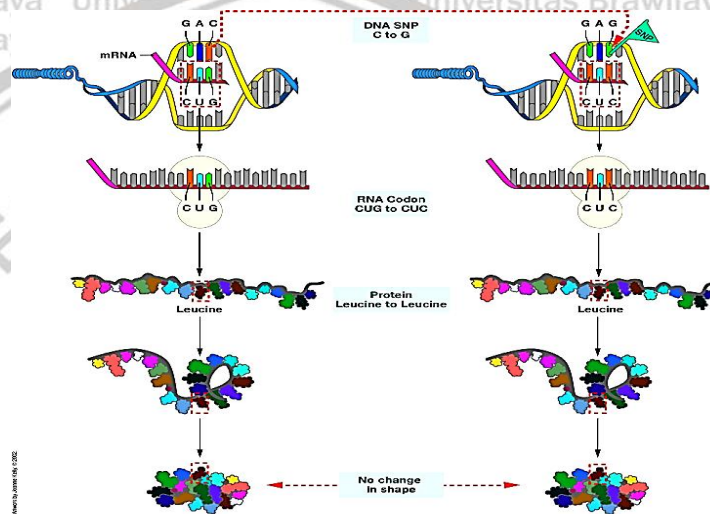
2.4.2 Microsatellite Polymorphism

Polimorfisme ini juga dikenal dengan sebutan *Short Tandem Repeats* (STR) dan *Simple Sequence Repeats* (SSR). Pada polimorfisme jenis ini, terjadi pengulangan nukleotida. Locus mikrosatelit yang terdapat pada alel dapat ditentukan secara genotip dengan menentukan panjang fragmen nukleotida melalui metode PCR. Mikrosatelit dalam nukleotida merupakan suatu urutan basa n pada DNA, terdiri dari dua sampai tujuh basa yang berulang-ulang, dengan atau tanpa sela. Misalnya, mikrosatelit nukleotida GAG yang memiliki pengulangan 10 kali akan memiliki bentuk: "GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG". Panjang pengulangan ini bervariasi tergantung individu/varietas dan diwariskan kepada generasi berikutnya. Resiko terjadinya mutasi lebih besar pada jenis polimorfisme seperti ini.

2.4.3 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) adalah perubahan satu molekul basa dari suatu sekuensing DNA yang terjadi dalam proporsi yang signifikan didalam suatu populasi (Gambar 2.16). Pada populasi manusia, 99.9% pasangan basa DNA adalah sama. Sekitar 0.1% DNA berbeda yang menyebabkan setiap

orang unik, berbeda antara satu dengan yang lainnya. termasuk kerentanan terhadap penyakit dan respon terhadap pengobatan. SNP dapat ditemukan pada keseluruhan genom, meliputi promotor, ekson dan intron dengan angka kejadian 1/1000 pasangan basa sampai 1/300 pasangan basa. SNP terbanyak pada daerah *non coding* dan sering pada allele C dan T. SNP yang terjadi pada daerah *coding* dapat merubah struktur protein yang dihasilkan (Guerra and Yu, 2005).



Gambar 2.16 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

2.4.4 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme

2.4.4.1 Sekuensing DNA

Ini merupakan cara yang paling langsung untuk mendeteksi adanya SNP. DNA dapat disekuensing dengan menggunakan mesin sekuenser. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu lama dan biaya mahal. Kerugian lain adalah kesalahan sekuensing. Tingkat kesalahan satu basa per 100 basa akan menyulitkan deteksi dari SNP. (Jehan et Lakhanpaul, 2006)

2.4.4.2 Elektroforesis Multiplex

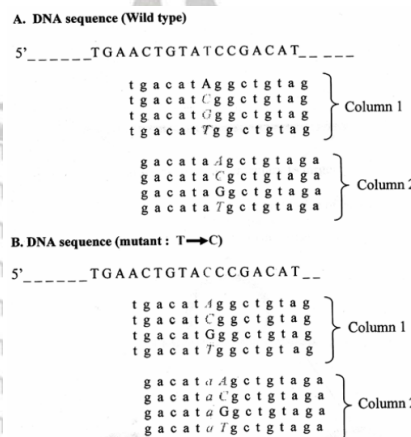
Merupakan cara mendeteksi polimorfisme melalui perbedaan pola migrasi sekuens DNA. Ini merupakan cara yang sensitif dan murah untuk mendeteksi adanya SNP.

2.4.4.3 PNA Directed PCR Clamping

Peptide Nucleic Acid (PNA) merupakan analog DNA. PNA merupakan kopi dari DNA yang poten. Dupleks dari PNA/DNA lebih stabil terhadap suhu dibandingkan dupleks DNA/DNA. Hal ini membuatnya menjadi alat efektif untuk analisa genotyping SNP. (Jehan et Lakhanpaul, 2006)

2.4.4.4 Microarrays (DNA chips)

Merupakan oligonukleotida yang ditempelkan pada permukaan padat. Sekarang digunakan rutin untuk analisa SNP dan sering digunakan untuk analisa multiplex (Gambar 2.17). Dasar teorinya adalah prinsip *sequencing by hybridization*.

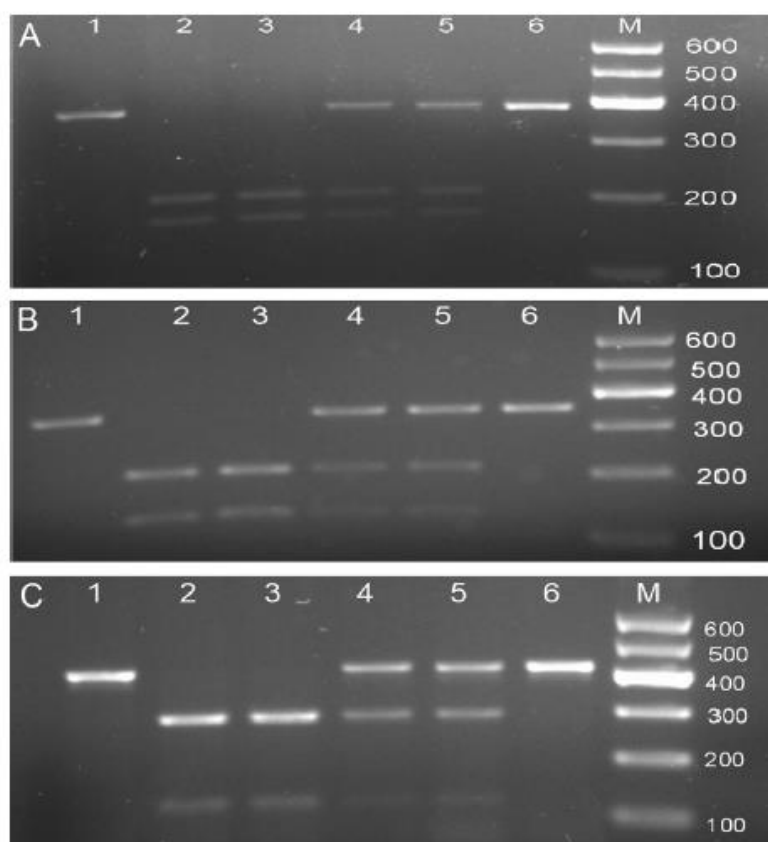


Gambar 2.17 Pemeriksaan Polimorfisme Menggunakan Metode *Microarrays*

2.4.4.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Teknik ini berdasarkan dari sifat enzim *cleavase*. Hal ini berdasarkan pada pengamatan bahwa satu untai DNA melipat sendiri. Dari pemeriksaan elektroforesa didapatkan gambaran *barcode* yang menggambarkan karakteristik DNA. Perubahan pada satu nukleotida saja akan menyebabkan perubahan barcode. RFLP adalah salah satu teknik pertama yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens DNA. Deteksi RFLP dilakukan berdasarkan adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan oleh enzim restriksi terhadap DNA (Gambar 2.18). Berbagai mutasi atau polimorfisme yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dan menghasilkan fragmen dengan panjang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah elektroforesis pada gel, hibridisasi dan visualisasi (Fatchiyah *et al.*, 2011).

RFLP merupakan metode yang mempunyai akurasi yang tinggi dan mudah ditransfer antar laboratorium. Selain itu, RFLP bersifat kodominan sehingga dapat mendeteksi heterozogosititas dan tidak diperlukan informasi sekuens target. Adapun kekurangan RFLP diantaranya adalah dibutuhkan DNA dengan kemurnian tinggi dalam jumlah banyak, tidak bisa dilakukan otomatisasi, sedikit lokus yang terdeteksi, memerlukan pustaka probe yang sesuai, membutuhkan waktu yang banyak dan biaya yang besar (Fatchiyah *et al.*, 2011).



(Fatchiyah et al., 2011)

Gambar 2.18 Ilustrasi pemeriksaan RFLP

2.4.4.5 Flow Cytometry Based Genotyping

Pemeriksaan ini sangatlah efisien dan sensitif, tetapi memiliki keterbatasan dalam pemilihan primer yang harus sangat teliti. (Jehan et Lakhanpaul, 2006)

2.4.5 Polimorfisme Gen pada Tuberkulosis

Beberapa polimorfisme genetik telah diteliti kaitannya dengan tuberkulosis dengan hasil konsisten maupun tidak (Tabel 2.2). Gen yang diteliti mencakup gen yang bertanggung jawab tentang HLA/MHC, reseptor, sitokin dan molekul lainnya

(Azad et al., 2012)

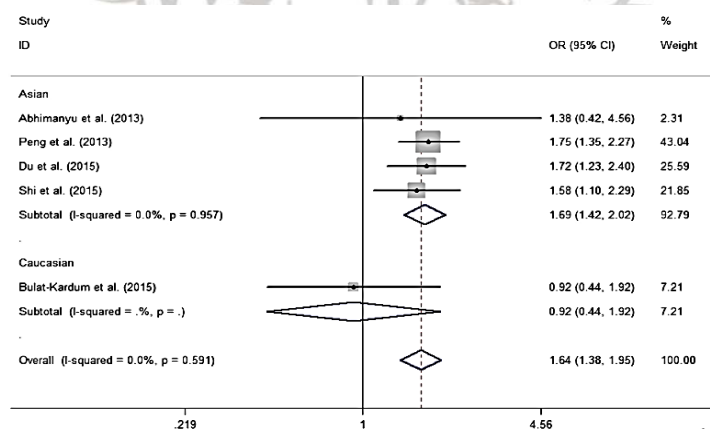
Tabel 2.2 Polimorfisme Gen pada Tuberkulosis

Gen	Polimorfisme	Negara	Hubungan dengan TB
MR	1186G/A	China	Ya
TLR1	N2485, S6021	Amerika	Ya
		Eropa	Ya
TLR2	R753Q (exon)	Turki	Ya
TIRAP	S180L	Indonesia	Tidak
		Rusia	Tidak
TLR4	D299G	Gambia	Tidak
TLR9	Rs352143	Amerika	Ya
CR1	Q1022H	Malawi	Ya
NOD2	P2685, R702W	Amerika	Ya
P2X7	1513A/C (exon)	Gambia, China	Tidak
		India	Ya
	-762T/C	Gambia, India	Ya
		Meksiko	Tidak
VDR	Apal	Guina-Bissau	Ya
MBL	Q allele	India	Ya
TNF	-238G/A	Colombia	Ya
IL-1B	-511T/C (promotor)	Gambia	Ya
IL-6	-174G/C	India	Tidak
		Iran	Ya
IL-8	-251T/A	Gambia	Tidak
IL-10	-1082G/A	Kamboja	Ya
MCP-1	-2518A/G	Tunisa	Ya
iNOS	-1026G Allele	Brazil	Ya
NRAMP1	274C Allele	Amerika	Ya

(Azad *et al.*, 2012)**2.4.6 Polimorfisme Interleukin 17 pada Tuberkulosis**

Jenis polimorfisme IL-17 pada tuberkulosis berupa Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Terdapat beberapa lokus gen yang merupakan tempat terjadinya SNP diantaranya rs22275913, rs3748067, rs763780, rs1889570, dan rs9382084. Istilah “rs” merupakan singkatan dari *Reference SNP Cluster Id* yang artinya tempat atau lokasi terjadinya SNP pada suatu cluster sekuensing molekul DNA (Zhao *et al.*, 2016).

Penelitian polimorfisme interleukin 17 dan kerentanan terhadap TB cukup banyak dilakukan di dunia namun hasilnya tidak konsisten. Penelitian di China menyebutkan polimorfisme IL-17F rs 763780 berhubungan dengan kerentanan terhadap TB (Shi *and* Zhang, 2015). Namun, penelitian di Kroasia menyatakan polimorfisme IL-17A dan IL-17F tidak berhubungan dengan kerentanan terhadap TB (Kardum *et al.*, 2015). Hal yang cukup menarik ditemukan pada penelitian di Brazil yang menyatakan bahwa polimorfisme IL-17A justru berhubungan dengan penurunan resiko terhadap tuberkulosis (Milano *et al.*, 2016). Penelitian meta analisa (Gambar 2.19) menyimpulkan bahwa polimorfisme IL-17F rs 763780 berhubungan dengan kerentanan terhadap tuberkulosis pada populasi Asia (Peng *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016)



(Zhao *et al.*, 2016)

Gambar 2.19 Meta Analisa Polimorfisme IL-17.

Hubungan antara polimorfisme gen IL-17 dengan kadar IL-17 dalam darah tepi masih perlu penelitian lebih lanjut. Berhubung ekspresi IL-17 tidak berbeda bermakna antara cairan BAL dan darah tepi, maka penelitian banyak menggunakan darah tepi karena prosedur yang tidak invasif (Dheda *et al.*, 2008). Suatu penelitian invitro menggunakan leukosit yang diinkubasi menggunakan

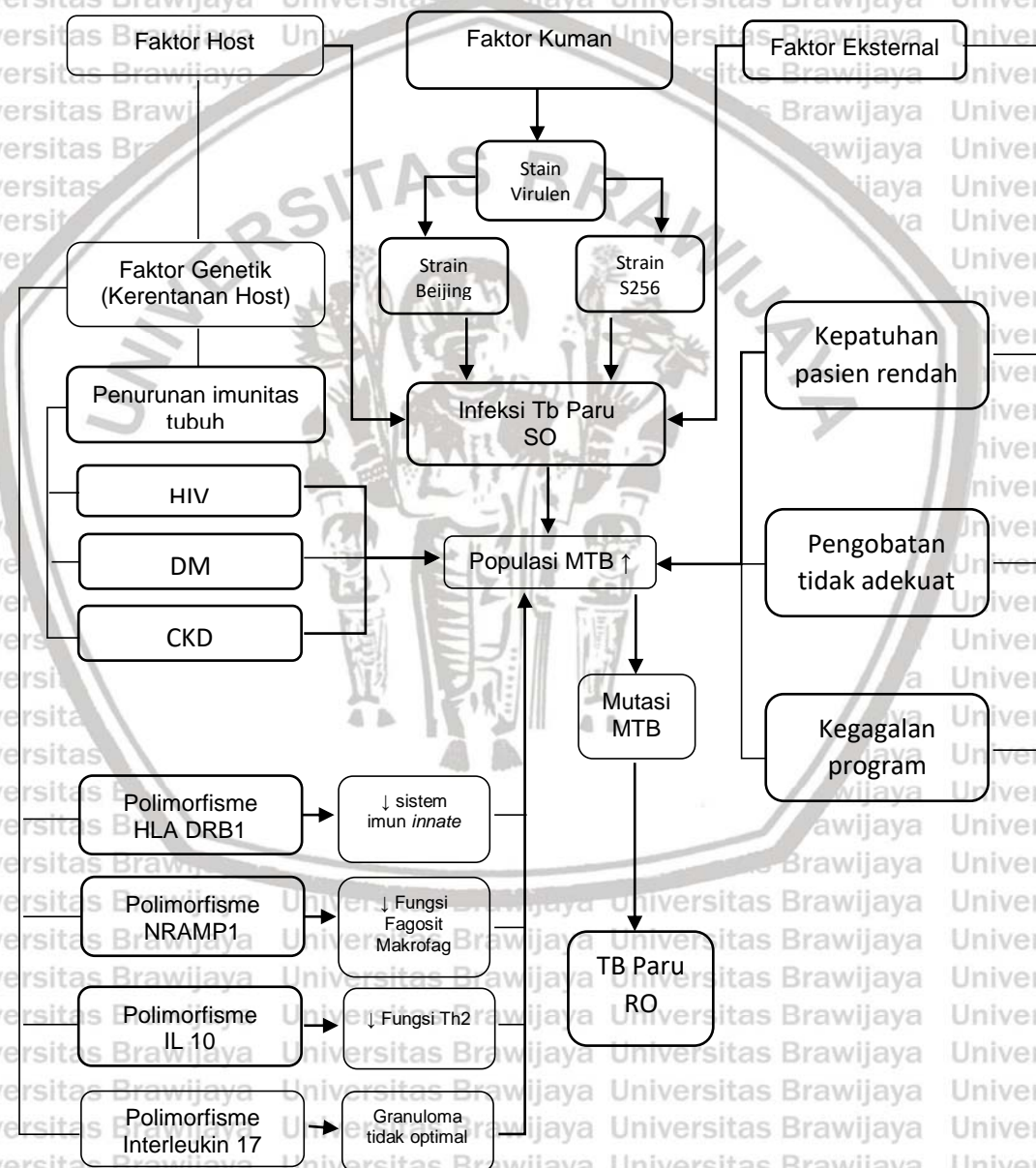
antigen tuberkulosis menyatakan bahwa kadar IL-17 pada individu kontrol sehat dan individu dengan polimorfisme IL-17A sama-sama meningkat dan berhubungan dengan luasnya lesi di paru (Rolandelli *et al.*, 2017). Namun, penelitian oleh Kawaguchi *et al* menyatakan bahwa IL-17 pada individu dengan polimorfisme tidak berfungsi sebagaimana mestinya. Polimorfisme IL-17F di daerah ekson ke-3 menyebabkan substitusi asam amino His (Histidine) ke Arg (Arginine) sehingga terganggunya proses sinyal intraseluler yang menyebabkan IL-17 kehilangan kemampuan untuk menginduksi sintesa protein pro inflamasi (Kawaguchi *et al.*, 2006).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian

Terjadinya tuberkulosis resisten obat ditentukan dari faktor *host*, faktor kuman dan faktor eksternal (Gambar 3.1). Respon tubuh terhadap infeksi TB dapat disebabkan oleh status imunitas orang itu sendiri dan kerentanan genetik terhadap infeksi. Penurunan imunitas tubuh akan menyebabkan tidak adanya penghalang dari Mtb untuk bereplikasi. Jumlah Mtb yang banyak akan menyebabkan resiko mutasi semakin besar sehingga terjadi TB MDR. Resiko mutasi sebesar 2.56×10^{-8} pembelahan sel dan resiko mutasi muncul jika jumlah sel sekitar 10^6 - 10^8 kuman Mtb (Pinto and Menzies, 2011; McGrath *et al.*, 2014).

Resiko terjadinya TB MDR pada orang dengan HIV positif sebesar 24% lebih tinggi daripada HIV negatif. Penurunan jumlah sel CD4+, membuat progresifitas tuberkulosis semakin cepat. Proses absorpsi obat OAT khususnya rifampisin dan etambutol juga dilaporkan berkurang pada pasien HIV (Mesfin *et al.*, 2014). Kontrol gula darah yang buruk berhubungan dengan tingginya populasi Mtb pada pasien diabetes. Kondisi hiperglikemi dihubungkan dengan penurunan fungsi makrofag dan kemotaksis sel radang, penurunan produksi ROS sehingga eradikasi Mtb terganggu (Fisher-Hock *et al.*, 2008). Gagal ginjal kronik stadium lanjut berhubungan dengan tingkat oksidatif yang tinggi, defisiensi vitamin D dan malnutrisi. Kondisi tersebut akan menurunkan fungsi sel limfosit T dan limfosit B. Pasien transplantasi ginjal akan menerima obat penekan sistem imun sehingga berpotensi terjadi reaktivasi tuberkulosis (Romanowski *et al.*, 2016).

Beberapa polimorfisme genetik telah diperiksa untuk menentukan kerentanan genetik terhadap TB MDR. Polimorfisme gen sistem imun bawaan diantaranya HLA DRB1, NRAMP1 telah dilakukan dengan hasil konsisten.

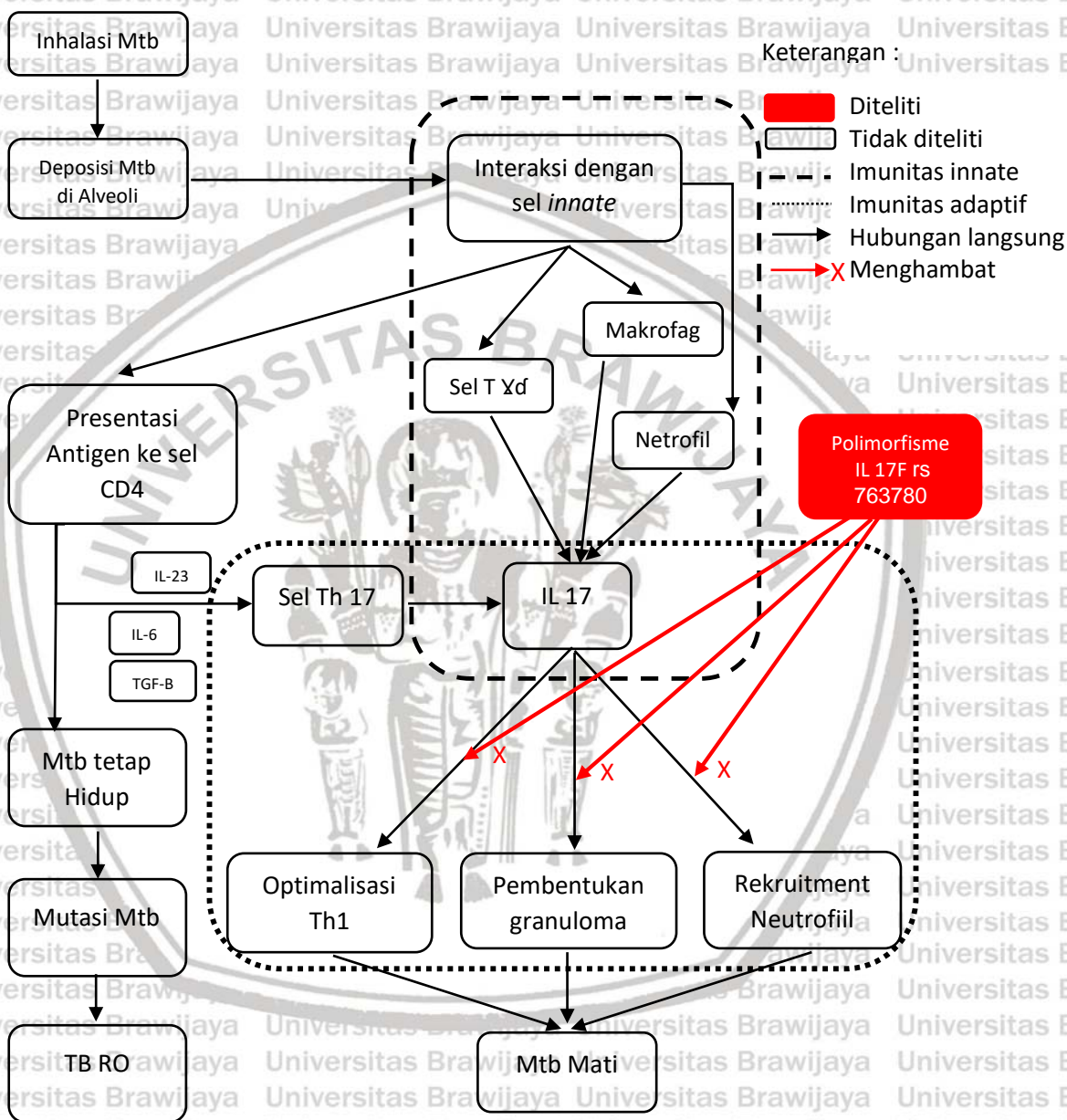
Polimorfisme sistem imun adaptif yang telah diperiksa diantaranya interleukin 2, IL-4, dan IL-10 juga dengan hasil konsisten (Sharma *et al.*, 2003; Vasantha *et al.*,

2015; Butov *et al.*, 2016). Sel Th 17 merupakan sumber utama IL 17 namun beberapa sel imun bawaan diketahui dapat mensekresikan Interleukin 17. Interleukin 17 berperan dalam infeksi awal Mtb, pembentukan granuloma, penarikan sel neutrofil dan optimalisasi respon sel Th1 (Torrado and Cooper, 2010).

Kepatuhan pengobatan TB merupakan hal yang sangat penting, karena bila pengobatan tidak dilakukan secara teratur dan tidak sesuai dengan waktu yang telah ditentukan maka akan dapat timbul kekebalan kuman TB terhadap Obat Anti TB. Tingkat pendidikan yang rendah menyebabkan persepsi pasien terhadap pengobatan dan kepatuhan pasien menurun (Pasek *et al.*, 2013). Pengobatan tuberkulosis yang tidak standar (monoterapi dan dosis tidak tepat) akan meningkatkan resiko resistensi. Fenomena "*fall and rise*" menjelaskan penggunaan monoterapi yang pada awalnya mampu menekan pertumbuhan kuman Mtb, namun beberapa kuman yang bertahan menjadi resisten terhadap obat tersebut dan terus tumbuh (Pinto and Menzies, 2011)

Strain atau jenis tertentu Mtb merupakan faktor resiko TB MDR. Beberapa Jenis MTB yang virulen atau ganas dilaporkan berkaitan dengan kegagalan pengobatan dengan terapi standar. Mtb tipe genotip Beijing pertama kali diisolasi tahun 1995 dan dihubungkan dengan kejadian penyebaran kasus TB MDR di Amerika (Caws *et al.*, 2006). Adapun Mtb genotip jenis S256 dilaporkan berkaitan dengan tingginya angka resistensi primer terhadap kanamisin di Rusia (Zhdanova *et al.*, 2013). Indonesia sebagai negara kepulauan memiliki distribusi genotip Mtb yang berbeda. Mtb genotip Beijing banyak ditemukan di Indonesia bagian barat, sementara genotip *East-African-Indian* banyak ditemukan di Indonesia bagian tengah dan timur (Lisdawati *et al.*, 2015).

3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Depositi kuman Mtb di alveoli akan langsung direspon oleh beberapa sel imunitas bawaan diantaranya sel T Yd, sel NK dengan mensekresikan IL-17.

Interleukin 17 berperan sebagai mediator inflamasi saat awal terjadinya infeksi. IL-

17. Sel APC juga menangkap Mtb dan mempresentasikan antigen ke sel limfosit T naif yang berada di limfonodi terdekat. Dengan pengaruh IL-6, IL-23 dan TGF β , maka sel T naif berdiferensiasi menjadi sel T helper 17 (Sel Th 17). Sel Th 17 ini merupakan sumber utama IL-17. Interleukin 17 berperan didalam rekrutment neutrofil, pembentukan granuloma, aktivasi makrofag dan optimalisasi fungsi sel Th1. Makrofag yang teraktivasi akan membunuh Mtb. Sel neutrofil dan sel radang lainnya akan membentuk granuloma, dimana akan membatasi replikasi dan penyebaran Mtb. Apabila terjadi polimorfisme IL-17, maka replikasi Mtb terus berlangsung dan fungsi granuloma tidak optimal sehingga populasi Mtb meningkat dan beresiko terjadinya mutasi spontan yang menyebabkan TB RO

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Prevalensi polimorfisme IL-17F rs 763780 lebih tinggi pada kelompok tuberkulosis paru dan tuberkulosis paru resisten obat daripada subjek sehat.
2. Adanya polimorfisme IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan terhadap tuberkulosis paru.
3. Adanya polimorfisme IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan tuberkulosis paru resisten obat.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian adalah *Case Control Study*. Penelitian untuk mengetahui polimorfisme IL-17F rs 763780 pada tuberkulosis paru dan TB RO.

4.2 Subyek Penelitian dan Besar Sampel

Populasi sampel adalah pasien dengan tuberkulosis paru yang berobat di poli paru atau rawat inap RS dr. Saiful Anwar Malang. Populasi ini juga meliputi pasien dengan tuberkulosis paru resisten obat untuk dianalisa lebih lanjut.

Seluruh etnis yang berobat di poli paru atau rawat inap RS dr. Saiful Anwar Malang dimasukkan dalam penelitian dan dicatat.

Jumlah sampel dihitung dengan rumus :

$$n = \frac{(p_0.q_0 + p_1.q_1)(Z_{1-\alpha^2} + Z_{1-\beta})^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel minimal kelompok kasus dan kontrol

$Z_{1-\alpha^2}$ = nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan tingkat kemaknaan (untuk $\alpha = 0,05$ adalah 1,96)

$Z_{1-\beta}$ = nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan kuasa (power) sebesar diinginkan (untuk $\beta = 0,10$ adalah 1,28)

p_0 = proporsi pada kelompok sehat (0.4)

p_1 = proporsi kelompok tuberkulosis paru bta positif (0.73) (Permenkes RI, 2011).

$$q_0 = 1 - p_0 \text{ dan } q_1 = 1 - p_1$$

Maka

$$n_1 = n_2 = n_3 = \frac{(0,4 \times 0,6 + 0,73 \times 0,27)(1,96 \times 1,28)^2}{[0,73 - 0,4]^2} = 25,26$$

dibulatkan menjadi 26/kelompok

Kelompok Kasus:

- Penderita tuberkulosis paru
- Penderita tuberkulosis paru resisten obat.

Kelompok Kontrol adalah:

- Subjek sehat

Kelompok kontrol digunakan subjek sehat. Pada kelompok ini dilakukan pemeriksaan foto polos dada terlebih dahulu untuk menyingkirkan kemungkinan infeksi TB paru aktif.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di bagian rawat jalan dan rawat inap SMF Paru di RS Saiful Anwar Malang dan laboratorium Biosain Universitas Brawijaya

Pembuatan proposal : Agustus 2017

Waktu penelitian : September 2017 – Januari 2018

Pengolahan dan analisa data : Februari - Maret 2018

Penyusunan laporan : Maret 2018

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi:

Pasien yang didiagnosa

- a. Tuberkulosis paru sensitif obat
- b. Tuberkulosis paru resisten obat
- c. Berusia antara 14-65 tahun
- d. Bersedia ikut penelitian dan menandatangani "informed consent"

Kriteria Eksklusi:

1. Penderita HIV-AIDS
2. Penderita dengan gagal ginjal kronik
3. Penderita dengan diabetes mellitus
4. Penderita penyakit autoimun
4. Penderita yang sedang hamil

4.5 Variabel Penelitian

Variabel Bebas:

- o Polimorfisme gen IL-17F rs 763780

Variabel Tergantung:

- o Kerentanan Terhadap Tuberkulosis paru dan tuberkulosis paru resisten obat

4.6 Definisi Operasional

1. Kerentanan terhadap tuberkulosis paru

Mudahnya seseorang terkena penyakit tuberkulosis paru, dilihat berdasarkan nilai *odds ratio*.

2. Tuberkulosis paru sensitif obat

Penderita tuberkulosis paru terkonfirmasi bakteriologis pada hasil pemeriksaan contoh uji biologinya (sputum) melalui pemeriksaan TCM (Xpert/MtbRif) dengan hasil *Mtb detected* dan *Rif resisten not detected*.

3. Tuberkulosis paru resisten obat

Penderita tuberkulosis paru terkonfirmasi bakteriologis pada hasil pemeriksaan contoh uji biologinya (sputum) melalui pemeriksaan TCM (Xpert/MtbRif) dengan hasil *Mtb detected* dan *Rif resisten detected*.

Terdapat lima kategori didalam kelompok ini yaitu:

- a. Monoresistance: resisten terhadap salah satu OAT, misalnya resisten isoniazid (H)
- b. Polyresistance: resisten terhadap lebih dari satu OAT, selain kombinasi isoniazid (H) dan rifampisin (R), misalnya resisten isoniazid dan etambutol (HE), rifampisin etambutol (RE), isoniazid etambutol dan streptomisin (HES), rifampisin etambutol dan streptomisin (RES).
- c. Multi Drug Resistance (MDR): resisten terhadap isoniazid dan rifampisin, dengan atau tanpa OAT lini pertama yang lain, misalnya resisten HR, HRE, HRES.

d. Extensively Drug Resistance (XDR): TB MDR disertai resistansi terhadap salah satu obat golongan fluorokuinolon dan salah satu dari OAT injeksi lini kedua (kapreomisin, kanamisin dan amikasin).

e. TB Resistan Rifampisin (TB-RR): Resistan terhadap rifampisin (monoresistan, poliresistan, TB MDR, TB XDR) yang terdeteksi menggunakan metode fenotip atau genotip dengan atau tanpa resistan OAT lainnya.

4. Subjek sehat

Individu dimana tidak dijumpai gejala klinis tuberkulosis paru dan pemeriksaan foto thorak dalam batas normal

5. Polimorfisme IL-17F rs 763780

Adanya polimorfisme IL-17F rs 763780 diperiksa dengan menggunakan teknik deteksi PCR – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

6. Penderita HIV-AIDS

Seseorang dengan gejala infeksi virus HIV-AIDS yang dibuktikan dengan hasil pemeriksaan determinan reaktif

7. Penderita diabetes mellitus

Penderita yang sudah didiagnosis diabetes mellitus berdasarkan catatan rekam medis baik yang menggunakan obat antidiabetes oral atau insulin.

8. Penderita penyakit autoimun

Penderita yang didiagnosis menderita penyakit-penyakit autoimun berdasarkan catatan rekam medis.

9. Penderita gagal ginjal kronik

Penderita yang didiagnosis menderita gagal ginjal kronik berdasarkan catatan rekam medis baik yang rutin menjalani hemodialisa atau tidak.

10. Wanita hamil

Wanita yang diketahui sedang hamil berdasarkan hasil wawancara.

4.7 Instrumen Pengumpulan Data

1. Formulir *informed consent*
2. Formulir data pasien penelitian
3. Kit pemeriksaan PCR
4. Kit pemeriksaan RFLP
5. Kapas alkohol
6. Vacutainer
7. Tabung EDTA
8. Sputum disposable 3 cc
9. Alat tulis untuk pencatatan

4.8 Prosedur pemeriksaan

4.8.1 Prosedur Pengambilan Darah Vena

Alat: S spuit *disposable* 3 ml, vakutainer, *torniquet*

Bahan: Kapas alkohol 70%

Cara pengambilan darah:

1. Bersihkan kulit di atas lokasi tusukan dengan alkohol 70% dan biarkan sampai kering.
2. Darah diambil dari *vena mediana cubiti* pada lipatan siku.
3. Pasang *torniquet* pada lengan atas dan subyek penelitian diminta untuk mengepal dan membuka telapak tangan berulang kali agar vena jelas terlihat.
4. Lokasi penusukan didesinfeksi dengan kapas alkohol 70% dengan cara berputar dari dalam ke luar.
5. S spuit disiapkan dengan memeriksa jarum dan penutupnya.
6. Setelah itu, *vena mediana cubiti* ditusuk dengan posisi sudut 45° dengan jarum menghadap ke atas.
7. Darah dibiarkan mengalir dalam jarum kemudian jarum diputar menghadap ke bawah. Agar aliran bebas, penderita diminta membuka kepalan tangannya, darah kemudian dihisap sebanyak 3 ml.
8. *Torniquet* dilepas, kemudian jarum ditarik dengan tetap menekan bekas tusukan dengan kapas alkohol.
9. Tempat bekas tusukan ditekan dengan kapas alkohol sampai tidak keluar darah lagi.
10. Setelah itu, bekas tusukan ditutup dengan plester.

4.8.2 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme IL-17 F rs 763780

Sampel darah vena diambil dengan cara aspirasi menggunakan jarum suntik sebanyak 3 cc dan dimasukkan dalam tabung bercampur EDTA kemudian dimasukan ke dalam freezer -20°C sampai dianalisa. Ekstraksi DNA menggunakan metode *salting out* berdasarkan protokol manual. Proses amplifikasi DNA menggunakan proses PCR (BIO RAD C1000 Thermal Cycler) sesuai protokol (Saitoh *et al.*, 2011). Proses PCR dimulai dengan mencampurkan sebanyak 90 μL Go Taq Green PCR mix, 45 μL H_2O free nuclease dan 5 μL masing masing primer *forward* 5 - GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC - 3 dan *reverse* 5 – AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC - 3 kemudian diambil masing masing 5 μL dicampur dengan 1 μL DNA yang telah diisolasi dan dimasukkan kedalam mesin PCR. Identifikasi posisi allele tempat terjadinya polimorfisme dilakukan dengan menginkubasi produk PCR dengan enzim restriksi *NlaIII* (New England Biolabs Ipswich, MA, USA). Hasil kemudian dilakukan proses elektroforesis pada gel agarose 2% (Saitoh *et al.*, 2011).

4.8.3 Prosedur Kerja Isolasi DNA Metode *Salting Out*

1. Masukkan 2 ml darah ke dalam tabung EDTA-vacutainer, kemudian goyangkan secara perlahan membentuk angka delapan.
2. Pindahkan darah dari tabung EDTA ke tabung sentrifuga, tambahkan 6 ml larutan pelisis darah merah (RBC lysis solution), kemudian inkubasi suhu ruang selama 10 menit.
3. Sentrifugasi kecepatan 1500 rpm pada suhu ruang selama 10 menit.
4. Ambil supernatant
5. Ulangi prosedur no 2 -4 sampai pellet berwarna putih.

6. Tambahkan pellet dengan 750 μ L larutan pelisis sel, kemudian lakukan homogenisasi.
7. Tambahkan 2 μ L RNase A, kocok kurang lebih 25 kali, dan inkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 15 menit.
8. Tambahkan 500 μ L larutan presipitasi protein (NH_4COOH) kemudian divorteks.
9. Sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 15 menit
10. Presipitat protein akan terbentuk berwarna cokelat muda.
11. Pindahkan supernatant yang mengandung DNA kedalam tabung eppendorf steril yang sudah berisi 1.5 ml etanol absolut
12. Kocok tabung secara perlahan sampai benang DNA berwarna putih dan pindahkan ke tabung baru.
13. Sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 10 menit untuk mengendapkan DNA.
14. Buang supernatant, Tambahkan pellet dengan etanol 70% kemudian sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm suhu 4 $^{\circ}$ C selama 15 menit.
15. Buang supernatant, kemudian keringkan pellet dalam inkubator pada suhu 57 $^{\circ}$ C.
16. Rehidrasi DNA dalam larutan buffer TE, kemudian tempatkan pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 2 jam untuk memperoleh DNA terlarut.

4.8.4 Protokol Pemeriksaan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Protokol pemeriksaan PCR adalah sebagai berikut:

1. Denaturasi awal suhu 94 $^{\circ}$ C selama 5 menit.

2. Diikuti 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C 45 detik, *annealing* 62°C 60 detik, ekstensi 72°C 60 detik.
3. Final ekstensi 72°C selama 10 menit

4.8.5 Prosedur Kerja Pemeriksaan RFLP

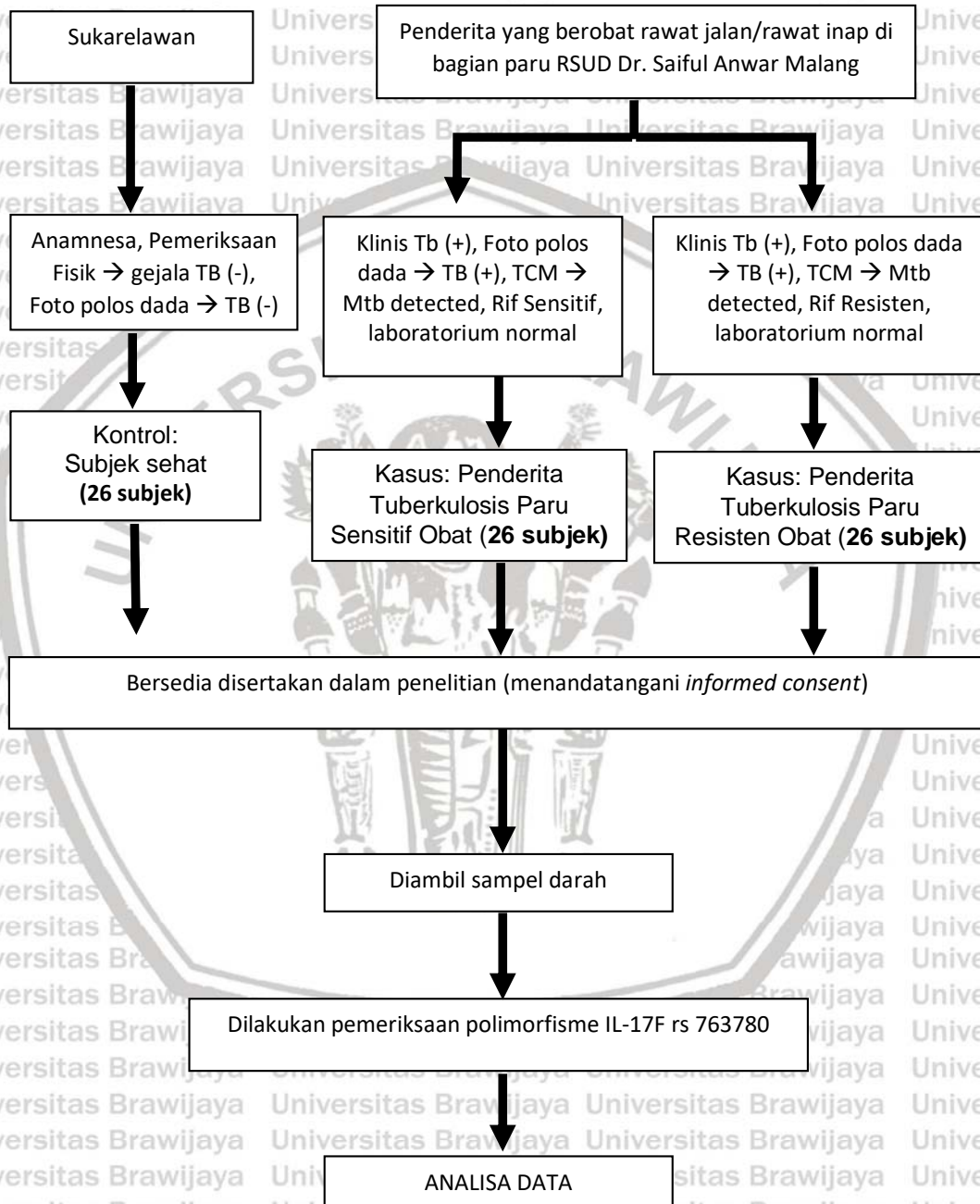
1. Siapkan isolat DNA genom yang murni sebagai bahan dasar pemotongan DNA dengan enzim restriksi.
2. Siapkan bahan yang diperlukan diantaranya H₂O 30 uL, digest buffer 5 uL, DNA 2 uL, enzim restriksi 0.5 – 1 uL. Campurkan bahan tersebut dan lakukan *spindown* sebarantar
3. Lakukan inkubasi pada suhu 37°C minimal selama 1 jam.
4. Stop aktivitas RE pada suhu 70°C selama 15 menit.
5. Tambahkan loading dye pada hasil restriksi ke dalam sumuran gel agarosa dengan konsentrasi 2% ditambah pewarnaam etidium bromida. Kemudian elektroforesis dijalankan sekitar 30-45 menit.
6. Visualisasi hasil gel elektroforesis dengan UV-transiluminator dan kamera polaroid.
7. Produk hasil RFLP adalah genotip CC 410bp dan 291bp, CT 410bp, 291bp dan 119bp, TT 291bp dan 119bp.

4.9 Teknik Pengumpulan Data

Cara Pengambilan sampel : Sampel diperoleh secara konsekutif pada penderita yang memenuhi kriteria inklusi – eksklusi di bagian rawat inap dan rawat jalan SMF Paru di RS Saiful Anwar Malang.

4.10 Alur Penelitian

BAGAN ALUR PENELITIAN



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.11 Teknik Pengolahan dan Analisa Data

Pengolahan dan Analisis Data menggunakan software IBM SPSS versi 20.0. Hubungan antara polimorfisme dengan tuberkulosis paru dan tuberkulosis paru resisten obat dianalisis dengan menggunakan uji *chisquare* menggunakan derajat kepercayaan 95%, $\alpha=0,05$, bermakna bila $p<0,05$. Sedangkan untuk mengetahui besar faktor resiko, dihitung dengan menggunakan OR (*odds ratio*).



BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

5.1.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian.

Tabel 5.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian.

Karakteristik		Kontrol N = 26		Kasus				Total N=80		P
				TB SO N = 27		TB RO N = 27				
				Jml	%	Jml	%			
Usia	Minimum	18		18		22		18		0.014 ^a
	Maksimum	37		58		65		65		
	Rata-rata±SD	27.19±6.09		35.37±13.2		37.15±12.6		33.31±11.8		
Jenis	Laki-laki	15	57.69	14	51.85	18	66.67	47	58.7	0.268
Kelamin	Perempuan	11	42.31	13	48.15	9	33.33	33	41.2	
Status	Kawin	16	61.54	18	66.67	23	85.19	57	71.3	0.111
Perkawinan	Belum Kawin	10	38.46	9	33.33	4	14.81	23	28.7	
Merokok	Ya	3	11.54	14	51.85	17	62.96	34	42.5	0.477
	Tidak	23	88.46	13	48.15	10	37.03	46	57.5	
Pendidikan	S1	25	96.15	9	33.33	12	44.44	46	57.5	0.409
	D3	0	0.00	1	3.70	1	3.70	2	2.5	
	SMA	1	3.85	17	62.96	10	37.04	28	35	
	SMP	0	0.00	0	0.00	4	14.81	4	5	
Pekerjaan	Pedagang	0	0.00	2	7.41	4	14.81	6	7.5	0.260
	Swasta	3	13.04	15	55.56	18	66.67	36	45	
	IRT	0	0.00	4	14.81	3	11.11	7	8.75	
	Petani	0	0.00	2	7.41	2	7.41	4	5	
	Mahasiswa	23	88.46	3	11.11	0	0.00	26	32.5	
	Pensiunan	0	0.00	1	3.70	0	0.00	1	1.25	
Penghasilan	> 3.5 Jt/bulan	0	0.00	4	14.81	2	7.40	6	11.1	0.033 ^b
	2.5-3.5 jt/bulan	2	7.69	6	22.22	8	29.62	16	29.6	
	1.5-2.5 jt/bulan	0	0.00	9	33.33	11	40.74	18	33.3	
	< 1.5 jt/bulan	0	0.00	8	29.62	6	22.22	14	25.9	

a uji Kruskal Wallis,

b uji chi square,

SD: Standar deviasi

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Berdasarkan rekapitulasi data didapatkan bahwa pada kelompok kasus TB SO didapatkan usia rata rata 35.37 tahun, pada kelompok TB RO usia rata rata 37.15 tahun dan pada kelompok kontrol rata rata 27.19 tahun. Analisis statistik untuk variabel usia dilakukan uji normality dengan uji Kolmogorov – smirnov menunjukkan data tidak terdistribusi normal ($p < 0.05$). Transformasi data ternyata masih menunjukkan tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis menunjukkan hipotesis 0 ditolak $p = 0.014 (<0.05)$, maka dilanjutkan dengan uji berganda dengan Mann Withney. Uji Mann Withney menunjukkan bahwa rata rata umur kelompok kontrol memiliki beda yang bermakna dengan kelompok TB RO dan TB SO. Rata rata umur kelompok TB SO memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol, tetapi tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok TB RO. Rata rata umur kelompok TB RO memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok Kontrol, tetapi tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok TB SO.

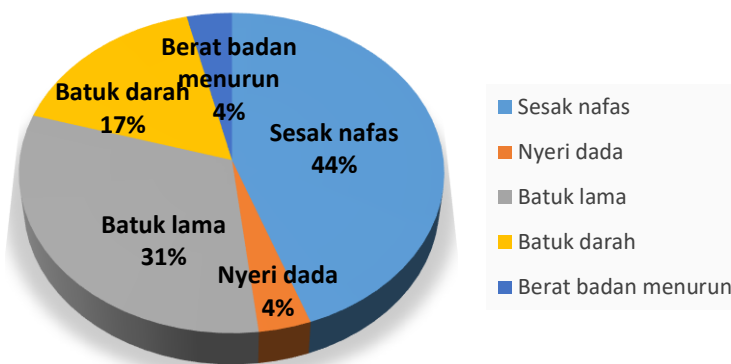
Untuk jenis kelamin didapatkan 51.85% laki-laki pada kelompok TB SO, 66.67% pada kelompok TB RO dan 57.69% pada kelompok kontrol. Untuk status perkawinan, sebagian besar subjek penelitian telah kawin yaitu 66.67% pada kelompok TB SO, 85.19% pada kelompok TB RO dan 61.54% pada kelompok kontrol.

Sebanyak 51.85% subjek merokok pada kelompok TB SO dan 62.96% pada kelompok TB RO. Namun pada kelompok kontrol sebagian besar tidak merokok yaitu sebanyak 88.46%. Sebagian besar kelompok kontrol berpendidikan sarjana sebesar 96.15% begitu juga kelompok TB RO yaitu sebesar 44.44%.

Sedangkan pada kelompok TB SO terbanyak berpendidikan SMA sebesar 62.96%. Pekerjaan pada sektor swasta mendominasi pada kelompok TB SO dan

TB RO yaitu sebesar 55.56% dan 66.67%, sedangkan pada kelompok kontrol terbanyak adalah mahasiswa sebesar 88.46%. Penghasilan 1.5 – 2.5 juta per bulan paling banyak pada kelompok TB SO dan TB RO yaitu sebanyak 33.33% dan 40.74%.

5.1.2 Karakteristik Klinis Subyek Penelitian



Gambar 5.1 Keluhan Utama Subyek Penelitian. (Sumber: Data primer penelitian diolah)

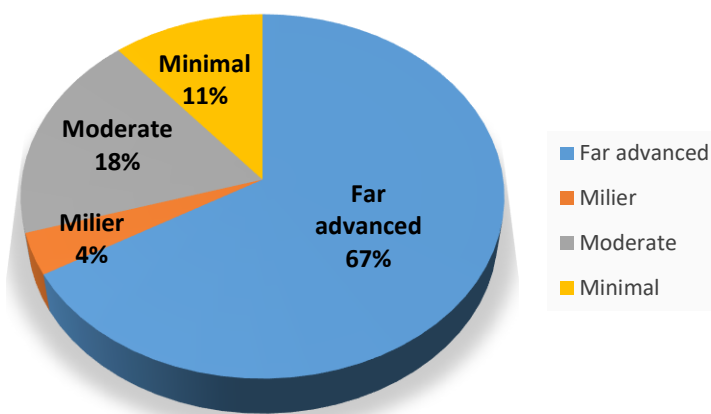
Keluhan terbanyak pada kelompok kasus baik kelompok TB SO dan TB RO adalah sesak nafas (44%).

Tabel 5.2 Keluhan Utama Subyek Penelitian Setiap Kelompok Kasus

Keluhan Utama	TB SO		TB RO		Total		P
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	
Sesak nafas	7	25.92	17	62.96	24	44	0.007
Batuk lama	15	55.55	2	7.40	17	31	
Nyeri dada	1	3.70	1	3.70	2	4	
Batuk darah	3	11.11	6	22.22	9	17	
Berat badan menurun	1	3.70	1	3.70	2	4	
Total	27	100	27	100	54	100	

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Keluhan utama terbanyak pada kelompok TB SO adalah batuk lama sebesar 55.55%, sedangkan keluhan utama terbanyak pada kelompok TB RO adalah sesak nafas sebanyak 62.96%.



Gambar 5.2 Gambaran Rontgen Dada Subyek Penelitian. (Sumber: Data primer penelitian diolah)

Gambaran rontgen dada terbanyak subjek penelitian untuk semua kelompok kasus baik kelompok TB SO dan TB RO adalah gambaran lesi luas (*far advanced lesion*) sebanyak 67%, sedangkan yang paling sedikit adalah lesi milier sebanyak 4%.

Tabel 5.3 Gambaran Rontgen Dada Pada Setiap Kelompok Kasus

Gambaran Rontgen Dada	TB SO		TB RO		Total		P
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	
<i>Far advanced lesion</i>	15	55.55	21	77.78	26	67	0.024
Milier	2	7.40	0	0.00	2	4	
<i>Moderate lesion</i>	4	14.81	6	22.22	10	18	
<i>Minimal lesion</i>	6	22.22	0	0.00	6	11	
Total	27	100	27	100	54	100	

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

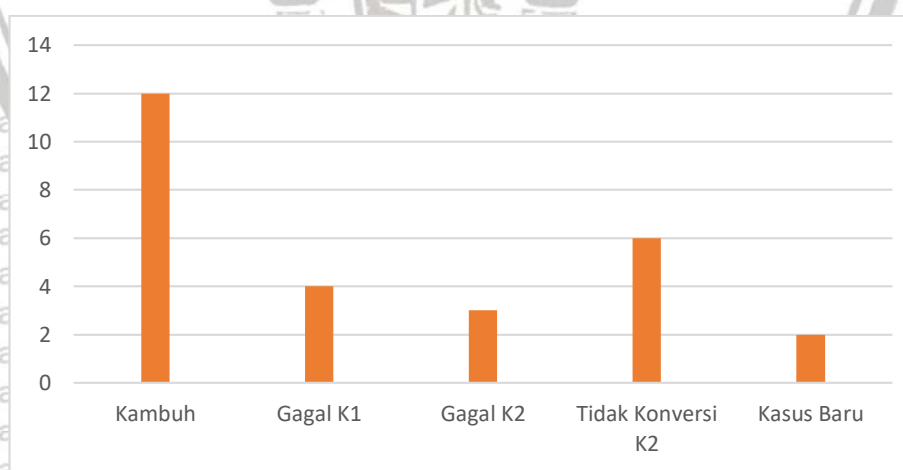
Gambaran rontgen dada yang paling banyak pada kedua kelompok kasus adalah gambaran lesi luas (*far advanced lesion*), namun jumlah lesi luas ini lebih banyak pada kelompok kasus TB RO yaitu sebesar 77.78%.

Tabel 5.4 Pemeriksaan TCM Subyek Penelitian

	Jumlah Mtb		TB SO		TB RO		Total		P
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	
<i>Very low</i>	3	11.11	2	7.40	5	9	0.943		
<i>Low</i>	8	29.62	7	25.92	15	29			
<i>Medium</i>	8	29.62	9	33.33	17	31			
<i>High</i>	8	29.62	9	33.33	17	31			
Total	27	100	27	100	54	100			

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada kelompok TB SO, jumlah kuman Mtb yang dapat terdeteksi sebesar 29.62% pada tingkat *low*, *medium* dan *high*. Sementara pada kelompok TB RO, jumlah kuman Mtb yang terdeteksi pada tingkat *medium* dan *high* adalah sebesar 33.33%.

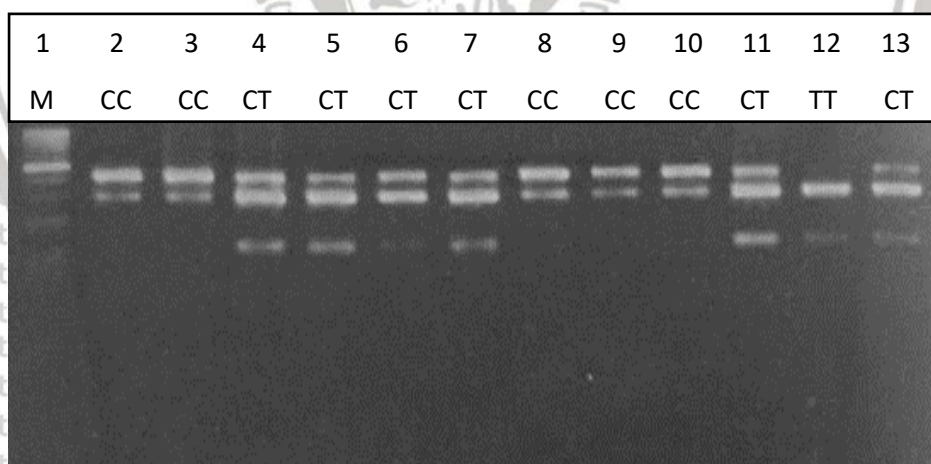


Gambar 5.3 Distribusi Tipe Pasien TB Resisten Obat (Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada gambar 5.3 tampak tipe pasien TB resisten obat paling banyak adalah kasus kambuh sebanyak 12 orang (44.4%), sementara yang paling sedikit adalah kasus baru sebanyak 2 orang (7.4%).

5.2 Hasil Pemeriksaan Polimorfisme IL-17F rs 763780

Pemeriksaan polimorfisme IL-17F rs 763780 menggunakan metode RFLP akan memperlihatkan potongan pita DNA yang sesuai dengan pembacaan pada gel agarosa (Gambar 5.4). Adapun produk dari metode RFLP ini adalah genotip CC, TT dan TC. Genotip CC ditunjukkan dengan produk 410bp dan 291bp, CT 410bp, 291bp dan 119bp, TT 291bp dan 119bp. Setiap genotip mengandung dua alel (kromosom diploid). Genotip CC mempunyai dua buah alel C, genotip TT mempunyai dua alel T dan genotip CT masing masing mempunyai satu alel C dan alel T.



Gambar 5.4 Hasil Polimorfisme Metode RFLP. Dari gambar tersebut dapat dilihat gambaran genotip CC, CT dan TT. M: marker DNA 100bp. (Sumber: Data primer penelitian diolah)

5.2.1 Frekuensi Alel dan Genotip IL-17F rs 763780

Tabel 5.5 Frekuensi Alel dan Genotip IL- 17F rs 763780

Variabel	TB SO		TB RO		Kontrol		P	P*	P**
	N	%	N	%	N	%			
TT	4	14.8	6	22.2	17	65.4	0.002	0.012	0.431
CT	14	51.9	9	33.3	8	30.8	0.068	0.744	0.137
CC	9	33.3	12	44.4	1	3.8	0.000	0.000	0.432
Alel T	22	40.7	21	38.9	42	80.8	0.001	0.001	0.842
Alel C	32	59.3	33	61.1	10	19.2	0.147	0.225	0.878

P: TB SO vs Kontrol; P*: TB RO vs kontrol; P**: TB SO vs TB RO

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada tabel 5.5 terlihat bahwa frekuensi alel T dan genotip TT paling banyak pada kelompok kontrol sehat (65.4% dan 80.8%). Sementara Alel C banyak pada kelompok TB SO dan TB RO. Pada kelompok TB SO, Alel C terbanyak pada kelompok genotip CT (heterozigot) sementara distribusi alel C pada kelompok TB RO adalah pada kelompok genotip CC (homozigot). Tidak ada perbedaan bermakna distribusi alel C dan genotip CT pada kelompok TB RO dan TB SO dibandingkan kontrol.

5.2.2 Uji Statistik Polimorfisme IL-17F rs 763780

Tabel 5.6 Hubungan Polimorfisme Kelompok TB dengan Kontrol

Variabel	TB SO + RO		Kontrol		OR (95%CI)	P
	N	%	N	%		
Normal	TT	10	15.5	17	65.4	ref
Polimorfisme	CT	23	42.6	8	30.8	2.44 (1.25 – 4.73)
	CC	21	38.8	1	3.8	13.2 (1.91 – 91.5)
Alel T	43	39.8	42	80.8	ref	
Alel C	65	60.2	10	19.2	8.31 (2.87 – 23.99)	0.000

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Berdasarkan tabel 5.6 terlihat bahwa prevalensi genotip (CC, CT) lebih besar dari pada kelompok kontrol. Secara umum, terdapat hubungan signifikan antara alel C dengan resiko terjadinya TB paru (OR 8.31; CI 95%= 2.87-23.99). Resiko terjadinya TB paru lebih besar apabila individu tersebut mempunyai genotip CC homozigot (OR 13.2; 95% CI = 1.91 – 91.5) dari pada genotip CT heterozigot (OR 2.44 ; 95% CI= 1.25 – 4.73).

Tabel 5.7 Hubungan Polimorfisme Kelompok TB SO dengan Kontrol

Variabel		TB SO		Kontrol		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Normal	TT	4	14.8	17	65.4	ref	
Polimorfisme	CT	14	51.9	8	30.8	2.44 (1.35 – 4.40)	0.001
	CC	9	33.3	1	3.8	8.09 (1.24 – 52.57)	0.000
Alel T		22	40.7	42	80.8	ref	
Alel C		32	59.3	10	19.2	15.1 (3.55 – 64.21)	0.000

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Dari tabel 5.7 tampak prevalensi genotip CC dan CT kelompok TB SO lebih besar dari pada kelompok kontrol. Terdapat hubungan signifikan antara genotip CC dan CT dengan resiko terjadinya TB SO (OR 8.09; 95% CI= 1.24 – 52.57 dan OR 2.44; 95% CI= 1.35 – 4.40).

Tabel 5.8 Hubungan Polimorfisme Kelompok TB RO dengan Kontrol

Variabel		TB RO		Kontrol		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Normal	TT	6	22.2	17	65.4	ref	
Polimorfisme	CT	9	33.3	8	30.8	1.57 (0.89 – 2.74)	0.083
	CC	12	44.4	1	3.8	9.45 (1.41 – 63.23)	0.000
Alel T		21	38.9	42	80.8	ref	
Alel C		33	61.1	10	19.2	6.61 (1.96 – 22.27)	0.002

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Tabel 5.8 menunjukkan prevalensi genotip CC dan CT kelompok TB RO lebih besar dari pada kelompok kontrol. Terdapat hubungan signifikan antara genotip CC dengan resiko terjadinya TB RO (OR 9.45; 95% CI= 1.41 – 63.23). Tidak terdapat hubungan yang signifikan antara genotip CT dengan resiko terjadinya TB RO (OR 1.57; 95% CI= 0.89 – 2.74).

Tabel 5.9 Hubungan Polimorfisme Kelompok TB SO dengan TB RO

Variabel		TB SO		TB RO		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Normal	TT	4	14.8	6	22.2	ref	
Polimorfisme	CT	14	51.9	9	33.3	1.53 (0.74 – 3.14)	0.269
	CC	9	33.3	12	44.4	1.09 (0.57 – 2.07)	0.794
Alel T		22	40.7	21	38.9	ref	
Alel C		32	59.3	33	61.1	1.64 (0.40 – 6.64)	0.484

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Berdasarkan tabel 5.9 tampak prevalensi genotip CT paling banyak pada kelompok TB SO (51.9%) sementara prevalensi genotip CC paling banyak pada kelompok TB RO (44.4%). Prevalensi alel C lebih tinggi pada kelompok TB RO (61.1%). Secara umum tidak terdapat hubungan antara alel C baik dalam bentuk genotip CC (homozigot) dan genotip CT (heterozigot) dengan resiko terjadinya TB RO jika dibandingkan dengan TB SO (OR 1.64; 95% CI= 0.4 – 6.64; P = 0.484)

Salah satu peranan IL-17 adalah pembentukan granuloma yang membatasi perkembangan Mtb. Untuk itu kami mencoba menghubungkan adanya polimorfisme IL-17F rs 763780 dari semua kelompok TB SO dan TB RO dengan Mtb yang terdeteksi pada pemeriksaan TCM sputum (Tabel 5.9). Kami

menggolongkan Mtb yang terdeteksi *high* dan *medium* kedalam kelompok “banyak”, sementara yang terdeteksi *low* dan *very low* kedalam kelompok “sedikit”.

Tabel 5.10 Hubungan Polimorfisme Kelompok TB dengan TCM Sputum

Variabel	Jumlah MTB				OR (95%CI)	p	
	Sedikit		Banyak				
	N	%	N	%			
Normal	TT	7	18.9	3	17.6	ref	
Polimorfisme	CT	14	37.8	9	52.9	0.66 (0.13 – 3.27)	0.463*
	CC	16	43.2	5	29.4	1.28 (0.23 – 6.96)	0.548*
Alel T		28	37.8	15	44.1	ref	
Alel C		46	62.2	19	55.9	1.08 (0.24 – 4.85)	0.615*

* 1- sided Fischer exact test

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Dari tabel 5.10 tampak bahwa tidak ada hubungan antara polimorfisme semua genotip (CC, CT) dengan jumlah Mtb (OR 1.28; 95% CI 0.23 – 6.96 dan OR 0.66; 95% CI 0.13 – 3.27). Secara umum tidak terdapat hubungan antara alel C baik dalam bentuk genotip CC (homozigot) dan genotip CT (heterozigot) dengan jumlah kuman Mycobacterium tuberculosis dalam sputum (OR 1.08; 95% CI= 0.24 – 4.85; P= 0.615).

BAB 6**DISKUSI****6.1 Karakteristik Subyek Penelitian****6.1.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian**

Secara sosiodemografis tidak terdapat perbedaan bermakna rata rata usia pada kelompok TB SO dan TB RO namun berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0.014$). Rata rata usia pada kelompok TB SO dan TB RO masuk pada kelompok usia dewasa produktif namun usia kelompok TB SO sedikit lebih muda daripada kelompok TB RO. Hal ini sesuai dengan laporan WHO tahun 2015 dan Permenkes RI tahun 2016 yang menyatakan bahwa insiden tuberkulosis terbanyak pada kelompok usia dewasa produktif. Penelitian yang dilakukan Dodd *et al* menemukan bahwa insiden tuberkulosis pada usia dewasa lebih tinggi 1.5 – 6 kali lipat daripada kelompok anak dan remaja. Hal ini disebabkan oleh kecenderungan kontak yang lebih besar diantara pergaulan sosial dan rumah tangga terutama kontak dengan laki-laki dewasa (Dodd *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini didapatkan jenis kelamin laki laki lebih banyak dibandingkan perempuan pada semua kelompok kasus dan kontrol. Jenis kelamin laki laki dihubungkan dengan peningkatan resiko tuberkulosis. Laporan WHO tahun 2015, Permenkes RI tahun 2016 dan penelitian yang dilakukan oleh Glaziou *et al* menyebutkan rasio kasus tuberkulosis laki laki banding perempuan adalah 1.5 – 2.1 : 1. Penjelasan mengenai perbedaan rasio ini sebenarnya masih belum

dapat dimengerti. Penjelasan yang memungkinkan meliputi perbedaan biologis antara laki-laki dan perempuan dalam kelompok umur tertentu yang berakibat terhadap resiko terinfeksi atau resiko progresifitas penyakit, perbedaan peranan sosial laki-laki dan perempuan yang mempengaruhi resiko mereka tertular penyakit, akses pelayanan kesehatan yang mungkin berbeda antara laki-laki dan perempuan (Glaziolu *et al.*, 2015). Faktor resiko yang berpengaruh terhadap infeksi tuberkulosis seperti konsumsi alkohol, merokok dan pengguna narkoba juga lebih sering ditemukan pada laki-laki daripada perempuan (Thorson *et al.*, 2007).

Jumlah subyek yang merokok lebih tinggi pada kelompok kasus TB SO dan TB RO daripada kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian di India, Korea Selatan dan China (Ho Lin *et al.*, 2008; Ha Jee *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2010). Merokok merupakan faktor resiko tuberkulosis paru. Merokok akan memperburuk respon terapi dan *outcome* terhadap tuberkulosis (Leung *et al.*, 2014). Suatu studi populasi menemukan bahwa merokok akan meningkatkan resiko terjadinya reaktivasi dari kasus tuberkulosis yang telah sembuh dan meningkatkan resiko terjadinya TB RO (Yen *et al.*, 2014). Pada tingkat sel, asap rokok dapat mengganggu pergerakan silia sel epitel saluran nafas, menyebabkan hiperplasia sel gobet, dan metaplasia sel epitel gepeng (Schamberger *et al.*, 2015). Asap rokok juga mengganggu fungsi makrofag diantaranya menghambat migrasi menuju tempat infeksi tuberkulosis dan menghambat pembentukan fagolisosom pada makrofag yang terinfeksi Mtb (Shaobin *et al.*, 2011; O'leary *et al.*, 2016).

Tingkat pendapatan subyek pada kelompok kasus TB SO dan TB RO paling tinggi pada kisaran 1.5-2.5 juta perbulan. Berdasarkan penggolongannya, Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2014 membedakan pendapatan menjadi 4 golongan

yaitu Golongan pendapatan sangat tinggi, adalah jika pendapatan rata-rata lebih dari Rp. 3.500.000,00 per bulan. Golongan pendapatan tinggi adalah jika pendapatan rata-rata antara Rp. 2.500.000, 00 – s/d Rp. 3.500.000, 00 per bulan. Golongan pendapatan sedang adalah jika pendapatan rata-rata antara Rp. 1.500.000, 00 s/d Rp. 2.500.000,00 per bulan. Golongan pendapatan rendah adalah jika pendapatan rata-rata 1.500.000, 00 per bulan (BPS, 2014). Penelitian di India tahun 2012 menemukan prevalensi tuberkulosis paling tinggi pada kelompok masyarakat miskin. Kemiskinan erat kaitannya dengan kurangnya nutrisi, lemahnya akses kesehatan dan sanitasi lingkungan yang buruk. Semua faktor tersebut berhubungan dengan resiko penularan dan sakit tuberkulosis (Oxlade and Murray, 2012).

6.1.2 Karakteristik Klinis Subyek Penelitian

Pada penelitian ini terdapat perbedaan keluhan utama antara kelompok TB SO dan TB RO ($p = 0.007$). Keluhan terbanyak subjek penelitian kelompok TB SO adalah batuk lama lebih dari 2 minggu sementara keluhan utama terbanyak pada kelompok TB RO adalah sesak nafas. Menurut penelitian di Ethiopia dan India, keluhan utama terbanyak pasien tuberkulosis paru adalah batuk lama lebih dari 2 minggu (Tolossa *et al.*, 2014; Binepal *et al.*, 2015). Penelitian lain juga menyatakan tidak ada perbedaan manifestasi klinis antara TB SO dan TB RO kecuali jika dibarengi dengan infeksi HIV (Gandhi *et al.*, 2006; Schaaf *et al.*, 2009). Pada penelitian ini, sebagian besar subjek kasus TB RO sudah pernah terinfeksi tuberkulosis sebelumnya yang menyebabkan derajat kerusakan parunya lebih berat sehingga keluhan utamanya lebih berat. Hal ini sesuai dengan penelitian di

Brazil yang menyatakan bahwa *outcome* pada kasus TB MDR lebih buruk daripada TB SO (Micheletti *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini, gambaran foto rontgen terbanyak pada kelompok kasus TB SO dan TB RO adalah lesi luas (*far advanced lesion*). Hal ini sesuai dengan di Vietnam yang menyatakan gambaran rontgen terbanyak adalah lesi luas yang meliputi kavitas, konsolidasi, fibrosis terutama pada kelompok subjek dengan jenis kelamin laki-laki (Thorson *et al.*, 2006). Penelitian lainnya lebih lanjut membuktikan adanya perbedaan yang signifikan antara foto rontgen TB SO dan TB RO, dimana derajat kerusakan lebih luas pada kelompok TB RO. Kerusakan tersebut diantaranya kavitas, konsolidasi, bronkiektasis, atelectasis, bulla dan kalsifikasi (Icksan *et al.*, 2018).

Jumlah kuman Mtb yang terdeteksi melalui pemeriksaan TCM tidak berbeda bermakna antara kelompok TB SO dan TB RO. Pemeriksaan TCM pada kelompok TB RO menunjukkan sedikit lebih banyak jumlah kuman Mtb pada tingkat *medium* dan *high*. Penelitian kami tidak menggunakan pemeriksaan konvensional yaitu pengecatan sputum BTA. Menurut alur diagnosis TB, pemeriksaan TCM dapat menggantikan pemeriksaan BTA pada fasilitas kesehatan yang memiliki pemeriksaan TCM karena hasilnya yang lebih sensitif dibandingkan dengan pemeriksaan BTA. Selain itu, pemeriksaan TCM juga dapat mengidentifikasi resistensi Rifampisin sehingga langsung dapat memisahkan antara kelompok TB SO dan TB RO (Permenkes RI, 2016). Pemeriksaan TCM merupakan pemeriksaan molekuler yang mendeteksi kuman Mtb berdasarkan teknik amplifikasi DNA. Pengerjaannya berdasarkan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang menghitung jumlah ambang batas siklus pengulangan amplifikasi DNA dari Mtb itu sendiri / *Mtb -ct* (*M tuberculosis threshold-cycle*).

Pemeriksaan TCM merupakan metode semi kuantitatif yang hasilnya dinyatakan kedalam kelompok *very low*, *low*, *medium* dan *high*. Tingkat *high* dinyatakan jika terdapat ≤ 16 *Mtb Ct*, *medium* jika terdapat 16 – 22 *Mtb Ct*, *low* jika terdapat 22-28 *Mtb Ct* dan *very low* jika terdapat 28-38 *Mtb Ct*. Semakin rendah jumlah *Mtb Ct* semakin tinggi jumlah kuman *Mtb* yang terdeteksi. Hasil dari pemeriksaan TCM dapat disesuaikan dengan pemeriksaan sputum BTA menggunakan skala dari IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) dimana tingkat *high* setara dengan diatas atau sama dengan +2, *medium* setara dengan diatas atau sama dengan +1, *low* setara dengan dibawah atau sama dengan +1, *very low* setara dengan *scanty* atau dibawahnya (Blakemore *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini, tipe kasus TB RO yang tersering adalah kasus kambuh. Hal ini sesuai dengan penelitian di Georgia yang menyatakan tipe kasus resistensi tuberkulosis adalah pasien yang pernah diobati tuberkulosis sebelumnya. Hanya sebagian kecil merupakan kasus baru (Kempker *et al.*, 2015). Namun penelitian ini tidak merinci lebih lanjut tipe kasus yang pernah mendapat pengobatan tuberkulosis tersebut.

6.2 Analisa Pemeriksaan Polimorfisme IL-17F rs763780

6.2.1 Frekuensi Alel dan Genotip IL-17F rs 763780

Pada kelompok kontrol sehat, distribusi alel T dan genotip TT lebih banyak daripada alel C. Hal ini sesuai dengan penelitian di China dan Kroasia (Peng *et al.*, 2013; Shi and Zhang, 2015; Kardum *et al.*, 2015). Alel T dan genotip TT merupakan alel yang ditemukan dalam frekuensi yang cukup tinggi pada kelompok kontrol sehat pada populasi ras Kaukasia dan Asia sehingga dapat diduga alel T dan genotip TT ini memberikan efek protektif terhadap tuberkulosis paru pada

kebanyakan ras termasuk rumpun Melayu Mongoloid (Peng *et al.*, 2013). Efek protektif genotip TT pada tuberkulosis paru ternyata tidak muncul pada penyakit lain. Suatu penelitian di Jepang menyatakan genotip TT justru merupakan faktor resiko genetik terjadinya penyakit ulseratif colitis sementara alel C memberikan efek protektif pada penyakit tersebut (Arisawa *et al.*, 2008). Hal ini mendukung konsep tentang perbedaan variabilitas kerentanan genetik terhadap penyakit yang berbeda (Peng *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini, kami menemukan prevalensi alel C, genotip CC dan CT lebih tinggi pada kelompok tuberkulosis paru (sensitif obat dan resisten obat) dari pada kelompok kontrol. Hasil yang sama diperoleh jika dilakukan perbandingan berdasarkan kelompok TB SO dan TB RO dengan kontrol sehat. Hasil ini sesuai dengan penelitian di China (Peng *et al.*, 2013; Shi and Zhang, 2015). Hal yang menarik pada penelitian ini kami menemukan prevalensi yang jauh lebih tinggi daripada penelitian di China. Prevalensi genotip CC dan CT pada penelitian kami adalah 38.8% dan 42.6% sementara pada penelitian di China sebesar 1.7% dan 25.3% (Peng *et al.*, 2013) serta 9.23% dan 16.01% (Shi and Zhang, 2015). Penelitian di Kroasia (ras Kaukasia) tahun 2015 juga menghitung prevalensi genotip CC dan CT dan menemukan bahwa prevalensi genotip CT lebih rendah yaitu 5.36% dan tidak menemukan sama sekali genotip CC (Kardum *et al.*, 2015). Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan ras antara Asia dan Kaukasia (Zhao *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini, kami menemukan prevalensi genotip CC (homozigot) lebih besar pada kelompok TB RO dari pada TB SO. Sementara ini, belum ada penelitian lain yang menghitung prevalensi genotip CC pada kelompok TB RO

sehingga hasil penelitian kami dapat dijadikan acuan untuk penelitian lain dengan topik yang sama.

Kami juga menemukan 8 orang (30.8%) dengan polimorfisme genotip CT dan 1 orang (3.8%) dengan polimorfisme genotip CC pada kelompok kontrol. Pada kelompok ini, tidak didapatkan gejala tuberkulosis dan foto rontgen dada dalam batas normal. Hasil ini sesuai dengan penelitian di China yang juga menemukan polimorfisme genotip ini pada kontrol sehat dengan prevalensi yang lebih kecil dari pada kelompok kasus (Shi *and* Zhang, 2015).

6.2.2 Hubungan Polimorfisme dengan Kerentanan Tuberkulosis Paru

Hasil penelitian kami menemukan terdapat hubungan yang signifikan antara polimorfisme IL – 17F rs 763780 terhadap kerentanan tuberkulosis paru pada kelompok TB SO maupun TB RO pada genotip CC (OR 8.09; 95% CI= 1.24 – 52.57; OR 9.45; 95% CI= 1.41 – 63.23). Terdapat juga hubungan yang signifikan pada genotip CT (OR 2.44; 95% CI= 1.35 – 4.40) pada kelompok TB SO saja. Hal ini sesuai dengan penelitian di China (Peng *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2015; Shi *and* Zhang, 2015) namun bertolak belakang dengan penelitian di India dan Kroasia yang menyatakan tidak ada hubungan antara polimorfisme IL-17F rs 763780 dengan kerentanan terhadap tuberkulosis (Abhimanyu *et al.*, 2013; Kardum *et al.*, 2015). Penelitian kami juga sesuai dengan penelitian meta analisa oleh Zhao *et al* yang juga menemukan adanya hubungan signifikan alel C dan genotip CT hanya pada ras Asia saja. Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan etnis Asia dan Kaukasia dan mendukung teori faktor keturunan mungkin berpengaruh terhadap infeksi tuberkulosis. Selain itu, perbedaan ini juga dihubungkan dengan perbedaan status ekonomi antara ras Asia dan Kaukasia (Zhao *et al.*, 2016).

Polimorfisme IL-17F rs 763780 menyebabkan penurunan kualitas IL-17F.

Polimorfisme IL-17F di daerah ekson ke-3 menyebabkan substitusi asam amino His (Histidine) ke Arg (Arginine) sehingga terganggunya proses sinyal intraseluler yang menyebabkan IL-17 kehilangan kemampuan untuk menginduksi sintesa protein pro inflamasi (Kawaguchi *et al.*, 2006). Gangguan fungsi IL-17 pada tuberkulosis menyebabkan terganggunya pembentukan granuloma mononuclear, rekrutmen neutrofil dan sel radang lainnya sehingga terjadi perluasan infeksi Mtb (Torrado and Cooper, 2010). Belum jelas apakah polimorfisme IL-17F rs 763780 pada pasien tuberkulosis paru juga mempengaruhi kadar IL-17F. Penelitian oleh Abhimanyu *et al* menemukan bahwa tidak ada hubungan bermakna antara polimorfisme IL-17F dengan kadarnya didalam darah antara pasien tuberkulosis dan kontrol sehat (Abhimanyu *et al.*, 2013)

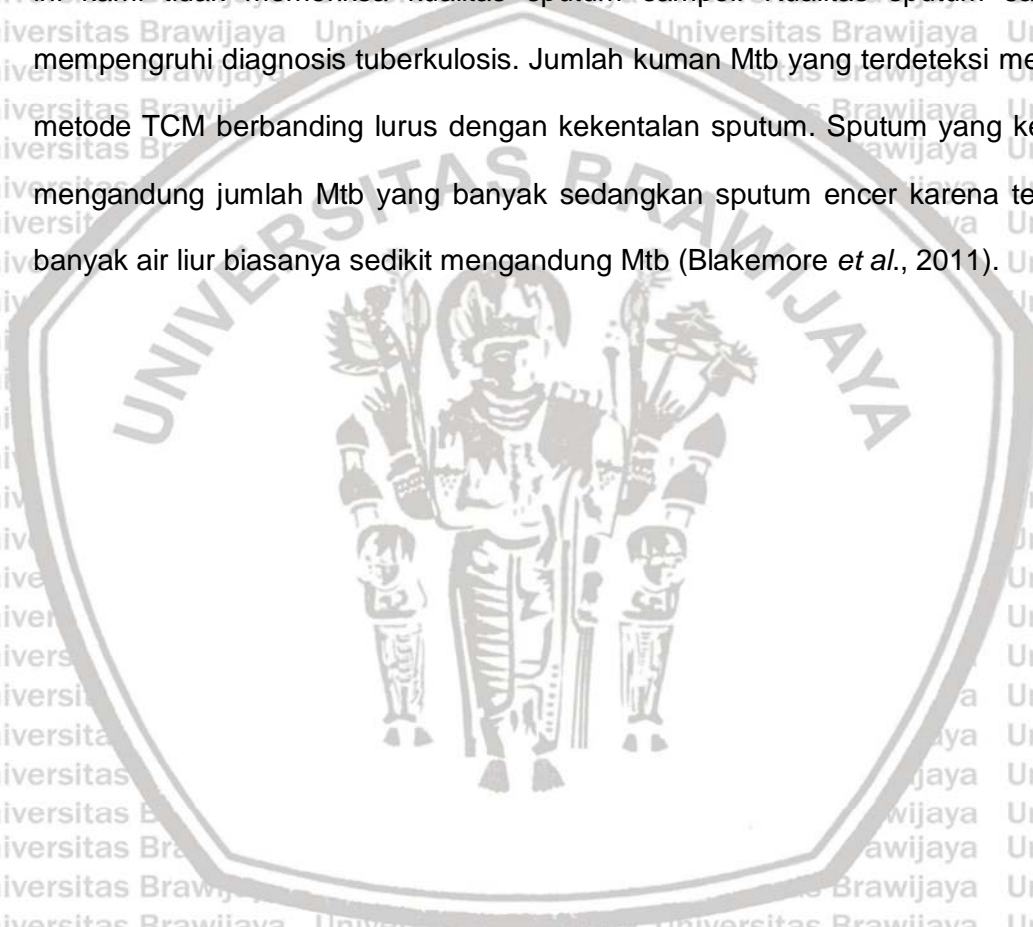
Hal menarik dari penelitian kami adalah adanya kerentanan yang lebih tinggi pada individu dengan genotip CC (homozigot) baik pada kelompok TB SO dan TB RO. Sampai saat ini belum banyak penelitian yang menghubungkan perbedaan genotip dengan kadar maupun kualitas sitokin IL-17F yang dihasilkan. Abhimanyu *et al* menemukan bahwa tidak ada perbedaan bermakna kadar IL-17F antara genotip TT dan CT pada kelompok penderita tuberkulosis paru dan kelompok kontrol (Abhimanyu *et al.*, 2013). Pada pasien asma, kadar IL-17A dan IL-17F sama sama meningkat dibanding subjek sehat namun terdapat perbedaan bermakna kadar IL-17F antara genotip TT dan CT dimana kadar IL-17F pada plasma lebih rendah hampir 10 kali lipat pada genotip CT dibanding TT (Bazzi *et al.*, 2011). Alel T bersifat dominan dan alel C merupakan alel minor. Oleh karena itu kami perkirakan individu dengan genotip CC (homozigot) mempunyai kadar IL-17F yang lebih rendah dari pada genotip CT. (heterozigot). Kadar yang lebih rendah

ini mengganggu aksis IL-17F/IFN- γ sehingga meningkatkan kerentanan terhadap tuberkulosis (Torrado *and* Cooper, 2010).

Penelitian kami menemukan bahwa tidak ada hubungan signifikan antara genotip polimorfisme (CC dan CT) terhadap kerentanan TB RO jika dibandingkan dengan TB SO. Sampai saat ini, belum ada penelitian yang menghubungkan polimorfisme IL-17F rs 763780 dengan kerentanan TB RO. Terdapat satu penelitian polimorfisme di India yang meneliti gen NRAM-1 dan satu penelitian di Indonesia meneliti gen IL-10 dan IFN- γ menggunakan populasi TB RO dengan hasil yang signifikan. Penelitian tersebut menggunakan kelompok sehat sebagai pembandingan sehingga tidak bisa menilai kerentanan pada kelompok TB SO menjadi TB RO (Marwoto *et al.*, 2015; Vasantha *et al.*, 2015; Sudarmo *et al.*, 2017). Hal yang dapat dipertimbangkan adalah bahwa pasien TB RO dulunya sebagian besar pernah menderita TB SO walaupun sebagian kecil dapat merupakan kasus baru sehingga kerentanannya hampir sama. Penelitian kami mendapatkan data bahwa hampir semua pasien TB RO pernah menderita TB SO sebelumnya dan hanya 2 orang saja (7.4%) merupakan kasus baru.

Resistensi tuberkulosis disebabkan mutasi kuman Mtb. Mutasi ini berhubungan erat dengan populasi kuman yang tinggi. Diperlukan sebesar 10^6 kuman Mtb untuk memunculkan resistensi terhadap Isoniazid dan Rifampicin (Colijn *et al.*, 2011). Pada penelitian ini, kami tidak menemukan adanya hubungan signifikan antara polimorfisme IL-17F rs 763780 alel C dalam bentuk genotip CC dan CT dengan jumlah kuman Mtb yang terdeteksi pada pemeriksaan TCM sputum (OR 1.08; 95% CI= 0.24 – 4.85; P = 0.615). Alel C dalam bentuk homozigot dan heterozigot menurunkan kualitas dan kuantitas IL-17F (Kawaguchi *et al.*, 2006; Bazzi *et al.*, 2011). Keseimbangan sitokin IL-17F dan IFN- γ pada saat awal

infeksi tuberkulosis sangat menentukan perjalanan infeksi selanjutnya. Kegagalan IL-17F menginduksi granuloma neutrofil dan menarik sel radang ketempat infeksi membuat Mtb tumbuh cepat dan resiko terjadinya resistensi (Colijn *et al.*, 2011; McGrath *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, kami menganggap jumlah Mtb pada sampel sputum tidak dapat mewakili jumlah Mtb yang sebenarnya. Pada penelitian ini kami tidak memeriksa kualitas sputum sampel. Kualitas sputum sangat mempengaruhi diagnosis tuberkulosis. Jumlah kuman Mtb yang terdeteksi melalui metode TCM berbanding lurus dengan kekentalan sputum. Sputum yang kental mengandung jumlah Mtb yang banyak sedangkan sputum encer karena terlalu banyak air liur biasanya sedikit mengandung Mtb (Blakemore *et al.*, 2011).



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Prevalensi polimorfisme IL-17F rs 763780 genotip CC dan CT pada kelompok tuberkulosis paru sensitif obat adalah 33.3% dan 51.9%.
2. Prevalensi polimorfisme IL-17F rs 763780 genotip CC dan CT pada kelompok tuberkulosis paru resisten obat adalah 44.4% dan 33.3%.
3. Prevalensi polimorfisme IL-17F rs 763780 genotip CC dan CT pada kelompok subjek sehat adalah 3.8% dan 30.8%.
4. Polimorfisme IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan terhadap tuberkulosis paru sensitif obat (OR 15.1; 95% CI = 3.55 – 64.21).
5. Polimorfisme IL-17F rs 763780 menyebabkan kerentanan terhadap tuberkulosis paru resisten obat (OR 6.61; 95% CI = 1.96 – 22.27).
6. Pada kelompok tuberkulosis paru sensitif obat, Individu dengan Polimorfisme IL-17F rs 763780 genotip CC (homozigot) lebih beresiko 3 kali lipat dibanding genotip CT (heterozigot), sedangkan pada kelompok tuberkulosis resisten obat resiko individu dengan genotip CC meningkat 6 kali lipat dibandingkan genotip CT.
7. Tidak terdapat hubungan signifikan antara polimorfisme IL-17F rs 763780 alel C dengan jumlah *Mycobacterium tuberculosis* yang terdeteksi pada sputum.

7.2 Saran

1. Dilakukan pemeriksaan kadar sitokin IL-17F untuk mengetahui pengaruh polimorfisme IL-17F terhadap sitokin yang dihasilkan.
2. Sebaiknya dilakukan pemeriksaan polimorfisme genetik lainnya karena kerentanan terhadap tuberkulosis bersifat poligenik terutama terhadap gen yang bertanggung jawab terhadap imunitas bawaan (*Toll Like Receptor*, *Mannosa Receptor*, *Natural Resistance Associated Macrophage-1*) sehingga di masa depan terapi tuberkulosis dapat bersifat individualistik dan *pharmacogenomics*.

